

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III
Prof. Dr. Wolfgang Herr
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Immunmechanismen der gastrointestinalen GVHD

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
David Kuhn

2018

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III
Prof. Dr. Wolfgang Herr
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Immunmechanismen der gastrointestinalen GVHD

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
David Kuhn

2018

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Edinger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Ritter

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2018

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
aGVHD	acute graft-versus-host-disease
Abb	Abbildung
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
alloKMT	allogene Knochenmarktransplantation
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin – Cyanin 7
APC	antigen presenting cell
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CCL-2	chemokine (C-C motif) ligand 2 (chemotaktisches Zytokin)
CD	cluster of differentiation
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
cGVHD	chronic graft-versus-host-disease
CIA	Kollagen induzierte Arthritis
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
DC	Dendritische Zelle
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	DL-Dithiotreitol
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al</i>	et alii
FACS	fluorescence activated cell sorting
FasL	Fas-Ligand
FCS	foetal calf serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Foxp3	forkhead box P3
Fc	fragment cristallizable

FSC-A	forward scatter area
gfp	green fluorescent protein
GI-GVHD	gastrointestinale GVHD
GITC	Guanidiniumthiocyanat
GITR	glucocorticoid induced tumor necrosis factor
GVHD	graft-versus-host-disease
GVL	graft-versus-leukemia
GVM	graft-versus-malignancy
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	human leucocyte antigen
IEL	intraepithelialer Lymphozyt
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEX	immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
KMges	Gesamt-Knochenmark
LAG-3	Lymphocyte activation gene 3
LPL	Lamina Propria Lymphozyt
LPS	Lipopolysaccharid
M	chemische Einheit: 1 mol / Liter
MACS	magnetic activated cell sorting
MHC	major histocompatibility complex
mHA	minor histocompatibility antigen
min	Minute
MIP-2	macrophage inflammatory protein 2
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
PB	Pacific Blue
PBS	phosphate buffered saline

PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin – Cyanin 7
PerCP	Peridinin Chlorophyll-a Protein
Reg3- α/γ	regenerating islet-derived protein 3- α/γ
RIC	reduced intensity conditioning
rpm	rounds per minute
SSC-A	side scatter area
Tab	Tabelle
Tconv	konventionelle T-Zelle
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF- β	transforming growth factor β
Th(1/2/17)-Zelle	T-Helfer Zelle Typ 1/2/17
TNF	tumor necrosis factor α
Tr1-Zelle	regulatorische T-Zelle Typ1
Treg	regulatorische T-Zelle
UV	ultraviolett

1	Einleitung	1
1.1	Die zentrale Rolle von nTreg in der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz	1
1.2	Effektormechanismen.....	2
1.2.1	Inhibitorische Zytokine	2
1.2.2	Störung des Zellstoffwechsels.....	3
1.2.3	Zytolyse	4
1.2.4	Beeinflussung dendritischer Zellen	5
1.3	Die allogene Knochenmarktransplantation	6
1.4	GVHD als Hauptkomplikation nach alloKMT	7
1.5	GVHD im murinen Modell	10
1.6	Zielsetzung.....	10
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Chemikalien und Lösungen.....	15
2.1.2	Histologische Puffer, Färbereagenzien und Medien	16
2.1.3	Zellbiologische Medien, Puffer und Lösungen	16
2.1.4	Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen	18
2.1.5	Magnetische <i>beads</i> zur Zellseparation	20
2.1.6	Molekularbiologische Reagenzien und Kits.....	20
2.1.7	cDNA-Primer für qRT-PCR-Analysen	20
2.1.8	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.9	Geräte	22
2.1.10	Versuchstiere	23
2.1.11	Software und Internetdienste.....	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Allogene Knochenmarktransplantation im murinen Modell.....	24
2.2.1.1	Konditionierung und Transplantation	24
2.2.1.2	<i>In vivo</i> Depletion von spenderstämmigen Treg	24
2.2.1.3	Beurteilung der äußeren Erscheinung (GVHD Score).....	25
2.2.1.4	Durchflusszytometrische Überwachung der Blutzusammensetzung.....	26
2.2.1.5	Tötung und Organentnahme.....	26
2.2.2	Zellbiologische Verfahren	27
2.2.2.1	Leukozytenisolierung aus der Milz.....	27
2.2.2.2	Leukozytenisolierung aus dem Knochenmark	28
2.2.2.3	Leukozytenisolierung aus den Lymphknoten	28
2.2.2.4	Leukozytenisolierung aus dem Dick- und Dünndarm	29
2.2.2.4.1	Isolierung von intraepithelialen Lymphozyten	29
2.2.2.4.2	Isolierung von Lamina Propria Lymphozyten	30
2.2.2.5	Quantifizierung isolierter Zellen.....	31
2.2.2.6	Immunphänotypisierung durch fluoreszente Antikörperfärbung.....	31
2.2.2.6.1	Oberflächenfärbung.....	31
2.2.2.6.2	Intrazelluläre Färbung	32
2.2.2.6.3	Durchflusszytometrische Analyse am LSR II.....	32
2.2.3	Molekularbiologische Verfahren	34
2.2.3.1	RNA-Extraktion aus Dick- und Dünndarmgewebe	34
2.2.3.2	Integritätsanalyse durch Gelelektrophorese	35
2.2.3.3	cDNA Transkription von RNA	36
2.2.3.4	qRT-PCR Analyse von cDNA	37
2.2.4	Histologische Analyse intestinaler Gewebe	38
2.2.4.1	Herstellung von Gewebeschnitten des Dick- und Dünndarms	38
2.2.4.2	HE-Färbung des Dick- und Dünndarm	38
2.2.4.3	Histopathologische Beurteilung von Darmpräparaten	39
2.2.4.4	Foxp3-Intrazellulärfärbung	39

2.2.4.5	Automatisierte Zellauszählung mit TissueFAXS	41
3	Ergebnisse	45
3.1	Vorversuche – Überleben nach alloKMT	45
3.2	Klinische Symptomatik nach Spender-Treg-Depletion	46
3.2.1	Ausschaltung von Spender-Treg an d26, 28 und 30 nach alloKMT („Langzeit“)	46
3.2.2	Ausschaltung von Spender-Treg an d5, 7 und 9 nach alloKMT („Kurzzeit“)	47
3.3	Histologische Veränderungen im GI-Trakt nach Treg-Depletion	48
3.3.1	Langzeit	48
3.3.2	Kurzzeit	50
3.4	Quantifizierung von mukosaständigen Treg	51
3.4.1	Langzeit	51
3.4.2	Kurzzeit	52
3.5	qRT-PCR Transkriptom-Analyse GVHD relevanter Gene in Dick- und Dünndarm	54
3.5.1	Langzeit	54
3.5.2	Kurzzeit	57
3.6	Charakterisierung organinfiltrierender Leukozyten mittels Durchflusszytometrie	61
3.6.1	Langzeit	61
3.6.1.1	Analyse extraintestinaler Organe	61
3.6.1.1.1	Vorbemerkungen und Zellzahlen	61
3.6.1.1.2	Organinfiltrierende Leukozyten der Milz	62
3.6.1.1.3	Organinfiltrierende Leukozyten im Knochenmark	65
3.6.1.1.4	Organinfiltrierende Leukozyten der Lymphknoten	67
3.6.1.1.5	Zusammenfassung	68
3.6.1.2	Analyse des Dick- und Dünndarms	69
3.6.1.2.1	Vorbemerkungen und Zellzahlen	69
3.6.1.2.2	Organinfiltrierende Leukozyten der Lamina Propria	71
3.6.1.2.3	Intraepitheliale Lymphozyten	78
3.6.1.2.4	Zusammenfassung	85
3.6.2	Kurzzeit	86
3.6.2.1	Analyse extraintestinaler Organe	86
3.6.2.1.1	Vorbemerkungen und Zellzahlen	86
3.6.2.1.2	Organinfiltrierende Leukozyten der Milz	87
3.6.2.1.3	Organinfiltrierende Leukozyten im Knochenmark	90
3.6.2.1.4	Organinfiltrierende Leukozyten der Lymphknoten	92
3.6.2.1.5	Zusammenfassung	95
3.6.2.2	Analyse des Dick- und Dünndarms	95
3.6.2.2.1	Vorbemerkungen und Zellzahlen	95
3.6.2.2.2	Organinfiltrierende Leukozyten der Lamina Propria	97
3.6.2.2.3	Intraepitheliale Lymphozyten	103
3.6.2.2.4	Zusammenfassung	109
4	Diskussion	111
5	Zusammenfassung	121
6	Eidesstattliche Erklärung	122
7	Publikationsverzeichnis	123

1 Einleitung

1.1 Die zentrale Rolle von nTreg in der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz

Die Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ ist für die Integrität höher entwickelter Lebewesen sowie zur Verhinderung von Autoimmunität von essentieller Bedeutung. Im Laufe der Evolution haben sich elaborierte Immunmechanismen entwickelt, die zum einen auf die Erkennung einer schier unendlichen Menge an Pathogenen abzielen, zum anderen aber körpereigene Strukturen vor einem Angriff verschonen sollen. Für die Zellen des adaptiven Immunsystems finden diese Differenzierungsvorgänge in den primären Lymphorganen statt, nämlich im Thymus für das T-Zell-Kompartiment und im Knochenmark die B-Zell-Entwicklung. Im Rahmen der thymischen T-Zell-Entwicklung stellt die Positivselektion sicher, dass T-Zellen eigene HLA-Moleküle erkennen und mit ihnen interagieren können, während die Negativselektion potentiell autoreaktive T-Zellen durch Apoptoseinduktion eliminiert und damit ihre Entlassung in die Peripherie verhindert. Aufgrund dieser zentralen Selektionsmechanismen werden lediglich 1-5% der sich entwickelnden T-Vorläuferzellen in die Peripherie entlassen [1]. Untersuchungen an gesunden Individuen belegen jedoch, dass selbst bei regelrechter Thymusfunktion autoreaktive T-Zellen in der Peripherie nachweisbar sind, so dass der physiologische Schutz vor Autoimmunität auch von peripheren Toleranzmechanismen getragen werden muss [2].

Unter den zellulären Effektoren der peripheren Toleranz spielen natürliche, das heißt im Thymus generierte, regulatorische T-Zellen (nTreg, im Folgenden als Treg bezeichnet) eine herausragende Rolle [3, 4]. Sakaguchi *et al.* leisteten Pionierarbeit bei der Beschreibung grundlegender Charakteristika dieser eigenständigen T-Zell-Subpopulation, die in Maus und Mensch mit nur 5-10% unter allen CD4⁺ T-Zellen eine vergleichsweise kleine Fraktion innerhalb des T-Zell-Kompartiments darstellt [5]. Ihre essentielle Rolle in der Vermittlung peripherer Toleranz wird durch die Beobachtung gestützt, dass die selektive Depletion dieser Zellfraktion in immunkompetenten Tieren zur Entwicklung einer letalen lymphoproliferativen Erkrankung führt und der Kotransfer von Treg den Ausbruch der Erkrankung verhindert [5]. Unter funktionellen Gesichtspunkten zeichnen sich Treg durch einen anergen Grundzustand aus und nur große Mengen an IL-2 während der T-Zell-Rezeptorstimulation vermögen diesen Zustand *in vitro* zu durchbrechen [6, 7]. *In vivo* scheinen Treg allerdings weniger hyporesponsiv zu sein und schon geringe Konzentrationen an Antigenen führen zur Expansion der dafür spezifischen Treg-Klone [8]. Nach Aktivierung supprimieren sie über

noch nicht abschließend geklärte Mechanismen Effektor-T-Zellen und andere hämatopoetische Zellen, ohne selbst proinflammatorische Zytokine zu sezernieren [4]. Treg weisen eine typische, jedoch nicht spezifische Signatur von intra- und extrazellulären Rezeptoren auf, die deren immunphänotypische Detektion durch durchflusszytometrische Verfahren ermöglicht. Dazu gehört neben der Expression von CD4, GITR und CTLA-4 auch CD25, die α -Kette des hochaffinen IL-2 Rezeptors [7, 9]. Neuere Untersuchungen konnten die essentielle Bedeutung des Transkriptionsfaktors Foxp3 für die Entwicklung von Treg sowie der Aufrechterhaltung ihrer suppressiven Kapazität aufzeigen, so dass Foxp3 als *master regulator* [10] dieser Zellart bezeichnet wird. Im Gegensatz zu anderen typischen Treg-Markern handelt es sich hierbei unter physiologischen Bedingungen – zumindest im murinen Organismus – um einen spezifischen Transkriptionsfaktor von Treg [11]. Molekulargenetische Untersuchungen deuten darauf hin, dass Foxp3 seine Effekte nicht alleine, sondern im Zusammenspiel mit einer Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren entfaltet und der Begriff des „Foxp3-Interaktoms“ erlangt in der aktuellen Forschung zunehmende Bedeutung [12]. Dennoch führen solitäre Funktionsverlustmutationen von Foxp3 im murinen System zum Erscheinungsbild der *scurfy mouse* und im Menschen zum sogenannten IPEX-Syndrom mit der klinischen Triade aus Immundysregulation, Entzündung exokriner und endokriner Drüsen und Kolitis [13, 14]. Demgegenüber kann durch ektope Expression von Foxp3 nach retroviraler Transduktion in konventionellen T-Zellen zumindest teilweise ein Treg-Phänotyp und suppressive Aktivität *in vitro* und *in vivo* induziert werden [10, 15]. Kürzlich beschrieben wurde, dass Treg-Zellen auch an Reparaturvorgängen nach Gewebeschädigung und an der Regulation der metabolischen Homöostase beteiligt sind [16, 17].

1.2 Effektormechanismen

Um ihre immunregulatorischen Funktionen ausüben zu können, verfügen Treg über ein Arsenal an Mechanismen, die sich anhand ihres Wirkmodus in Gruppen einordnen lassen.

1.2.1 Inhibitorische Zytokine

Die Bedeutung von IL-10 als löslicher Faktor der Treg-vermittelten Suppression wird trotz zahlreicher Untersuchungen nach wie vor kontrovers diskutiert. Während frühe *in vitro* Studien unter Einsatz blockierender Antikörper oder *knock out* Zellen die Relevanz von IL-10 anzweifeln [18, 19], scheinen die Effekte dieses Zytokins *in vivo* in vielen Modellen von

großer Relevanz zu sein [20, 21]. Die Tatsache, dass andere Zellen ebenfalls IL-10 sezernieren erschwert die Beurteilung der funktionellen Relevanz des von Treg-sezernierten IL-10 [21-24].

Während die Bedeutung von TGF- β für die Induktion der Treg-Entwicklung und Homöostase weitgehend akzeptiert ist [25, 26], bleibt die Studienlage zur Rolle dieses Zytokins in der Vermittlung von Suppression nicht konklusiv [27]. Ebenfalls unklar ist, ob TGF- β als löslicher Mediator fungiert, oder membrangebunden seine suppressive Wirkung im direkten Zellkontakt entfaltet, wie Nakamura *et al.* vorschlagen [28]. Möglicherweise spielt ein Vorgang, der unter *infectious tolerance* Bekanntheit erlangte, eine Rolle für die Vermittlung von Immunsuppression [29]. Danach läge die Hauptfunktion von membrangebundenen TGF- β in der Induktion einer tolerogenen Funktion in konventionellen T-Zellen (Tconv) sowie der Modulation von dendritischen Zellen (DCs) [30], was vor allem für homöostatische und/oder pathologische Prozesse im Gastrointestinaltrakt bedeutsam zu sein scheint [31].

Ein weiteres relevantes Zytokin könnte IL-35 sein. Nach seiner Entdeckung im Jahr 2007 konnte gezeigt werden, dass vor allem aktiv supprimierende Treg IL-35 exprimieren und genetische Defekte der beiden Bestandteile des als Heterodimer vorliegenden Moleküls – Ebi3 und IL-12a – zu einem Wirkverlust von Treg *in vitro* führen [32]. Seither konnten weitere IL-35 vermittelte Effekte aufgezeigt werden, unter anderem in Modellen der chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED), der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE), der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) sowie neuerdings auch in einem murinen Modell der GVHD [33].

1.2.2 Störung des Zellstoffwechsels

Der Beitrag des IL-2-Signalwegs zur suppressiven Kapazität von Treg ist *bis dato* nicht abschließend geklärt. Dennoch scheinen Treg die IL-2-abhängige Proliferation von Effektor-T-Zellen zu beeinflussen [9], wofür passive und aktive Wirkmodi vorgeschlagen wurden. Zum einen können Treg über ihren hochaffinen IL-2-Rezeptorkomplex lokales IL-2 absorbieren (*IL-2-sink*) und dadurch die Verfügbarkeit von IL-2 für Effektor-T-Zellen senken [19]. Zum anderen wurde nachgewiesen, dass Treg aktiv zur Drosselung der IL-2-Produktion in proliferierenden Effektor-Zellen beitragen, indem sie ihr transkriptionelles Programm modulieren [18, 19]. Der daraus resultierende Mangel an IL-2 könnte zur Proliferationshemmung beitragen oder zur Einleitung von Apoptose von Effektor-T-Zellen führen, wie bereits *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen [34, 35].

Ein weiterer Mechanismus wurde im Jahr 2006 erstmalig beschrieben und seine Relevanz in verschiedenen *in vitro* und *in vivo*-Modellen belegt. Demnach führt die Aktivität der auf Treg koexprimierten Exonucleotidasen CD39 und CD73 zu einem Abbau des universalen Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP), dessen extrazelluläres Vorkommen einen Zellschaden signalisiert und deshalb als *danger signal* gilt. Durch den enzymatischen Abbau von freiem ATP wird dessen proinflammatorische Wirkung auf eine Vielzahl anderer Immunzellen abgeschwächt, zum anderen wird die Konzentration von freiem Adenosin erhöht. Die Bindung von Adenosin an A_{2A}-Rezeptoren von Tconv führt zu einer Proliferationshemmung und zur Minderung ihrer Zytokinsekretion. Ähnliche immunmodulatorische Effekte auf andere Leukozytenklassen wie B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten und Monozyten werden vermutet [36-38]. Darüber hinaus scheint der Adenosin-A_{2A}-Rezeptor-Signalweg an der Induktion von LAG-3⁺ T-Zellen und peripher induzierten Treg (iTreg) beteiligt zu sein [39]. Ein Strukturverwandter des Adenosins – zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) – kann von Treg über *gap-junctions* direkt in Effektor-T-Zellen geschleust werden und entfaltet dort antiinflammatorische Wirkungen [40].

1.2.3 Zytolyse

Ein anderer Suppressionsmechanismus von Treg ist die Lyse von Effektor-Zellen durch verschiedene, zum Teil aus der Biologie anderer Leukozytenklassen bekannte Signalwege. So exprimieren murine Treg die Serinprotease Granzym B und Mutanten mit einer Defizienz dieses intrazellulär wirkenden Moleküls zeigten ein herabgesetztes suppressives Potential in *in vitro* Experimenten [41]. Als Zielzellen der von Treg vermittelten zytolytischen Aktivität konnten neben Effektor-T-Zellen auch NK-Zellen sowie B-Zellen identifiziert werden [42]. Bei den beiden erstgenannten scheint auch die Apoptoseeinleitung über Perforine, die durch Permeabilisierung der Zellmembran Zielzellen lysieren, eine Rolle zu spielen, wie aus einem Tumor-Modell abgeleitet werden kann [43].

Neuere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen adressierten die Rolle des TRAIL-DR5-Signalwegs in der Treg vermittelten Lyse von Effektor-T-Zellen [44]. Auch Galectin-1, ein als Homodimer sezerniertes oder membrangebundenes β -Galactosid-bindendes-Protein, scheint zum regulatorischen Repertoire von Treg zu zählen, wie *in vitro* Suppressionsassays mit Galectin-1-defizienten humanen und murinen Treg nahelegen [45]. Als Wirkmechanismus wird eine Antigen-unabhängige Bindung von T-Zell-Oberflächenantigenen (CD45, CD43, CD7) postuliert mit der Folge eines Zellzyklusarrests, Erliegen der Zytokin-

sekretion und der Einleitung von Apoptose [46]. Auch *in vivo* scheint der Galecin-1-Signalweg von Relevanz zu sein, wie in Modellen der EAE, der CIA und der GVHD nach alloKMT belegt [47-49].

1.2.4 Beeinflussung dendritischer Zellen

Als wesentlicher Mechanismus der Treg-vermittelten Suppression *in vitro* und *in vivo* gilt die Inhibierung der Reifung von DCs sowie die Behinderung ihrer Funktion als zentrale Aktivatoren von Effektor-T-Zellen. Hierfür spielt das von Treg konstitutiv exprimierte CTLA-4 eine wichtige Rolle [30], wie mehrere *in vitro* und *in vivo* Studien zeigen [50-53]. Durch Bindung von CTLA-4 an die Oberflächenmoleküle CD80/86 auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wird deren kostimulatorische Wirkung für naive T-Zellen blockiert (2. Signal der T-Zell-Aktivierung durch Bindung an CD28). Darüber hinaus wird die weitere Hochregulation von CD80/86 inhibiert und bereits in der Phospholipidmembran verankerte Liganden werden mittels Trogozytose (griechisch *trogo* = nagen) aus dem Bereich der immunologischen Synapse aktiv entfernt [30, 54, 55]. Die Relevanz von CTLA-4 auf Treg unterstreichen Untersuchungen an *knock out* Mutanten, die innerhalb von sieben Wochen an einer lymphoproliferativen autoimmunen Systemerkrankung versterben [53, 56].

Ein weiterer Effekt, der in einem murinen Modell der allogenen Transplantation von pankreatischen Inselzellen auf die Interaktion von CTLA-4 mit CD80 zurückgeführt werden konnte, ist die Induktion von IDO. Dieses Enzym ist in den Stoffwechsel der essentiellen Aminosäure Tryptophan involviert und wird von verschiedenen APCs exprimiert. Als Folge seiner Aktivität verarmt die Umgebung an Tryptophan und entstehende Metabolite führen zur Apoptose von Effektor-T-Zellen [57, 58].

Abschließend sei als APC-abhängiger Suppressionsmechanismus die Interaktion des hochaffinen CD4-Homologs LAG-3 auf Treg mit MHC II-Komplexen auf APCs genannt. Dadurch erhöht sich zum einen die suppressive Aktivität der beteiligten Treg, zum anderen wird im Zuge einer komplexen Signalkaskade in DCs ein unreifer, tolerogener Status gefestigt und die weitere Ausreifung der Zelle verhindert, wodurch ihr Potential zur Stimulierung von Effektor-T-Zellen herabgesetzt wird [59, 60].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass seit der Erstbeschreibung von Treg im Jahr 1995 durch Sakaguchi *et al.* zahlreiche Mechanismen für ihre suppressive Aktivität vorgeschlagen wurden. Die Relevanz der verschiedenen Mechanismen ist noch nicht abschließend geklärt, da die Ergebnisse von *in vitro* Studien und *in vivo* Modellen z.T. divergieren. *In vitro*

erscheint ein direkter Zellkontakt zwischen Treg und Tconv erforderlich für die suppressive Treg-Wirkung, während *in vivo* offensichtlich auch indirekte Treg-Effekte eine Rolle spielen [18, 19]. Die Besonderheiten der jeweiligen *in vivo*-Modelle sowie die Variabilität der Relevanz einzelner Mechanismen in unterschiedlichen Krankheitsmodellen erschwert die Beurteilung der zahlreichen Suppressionsmechanismen und verdeutlicht die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen.

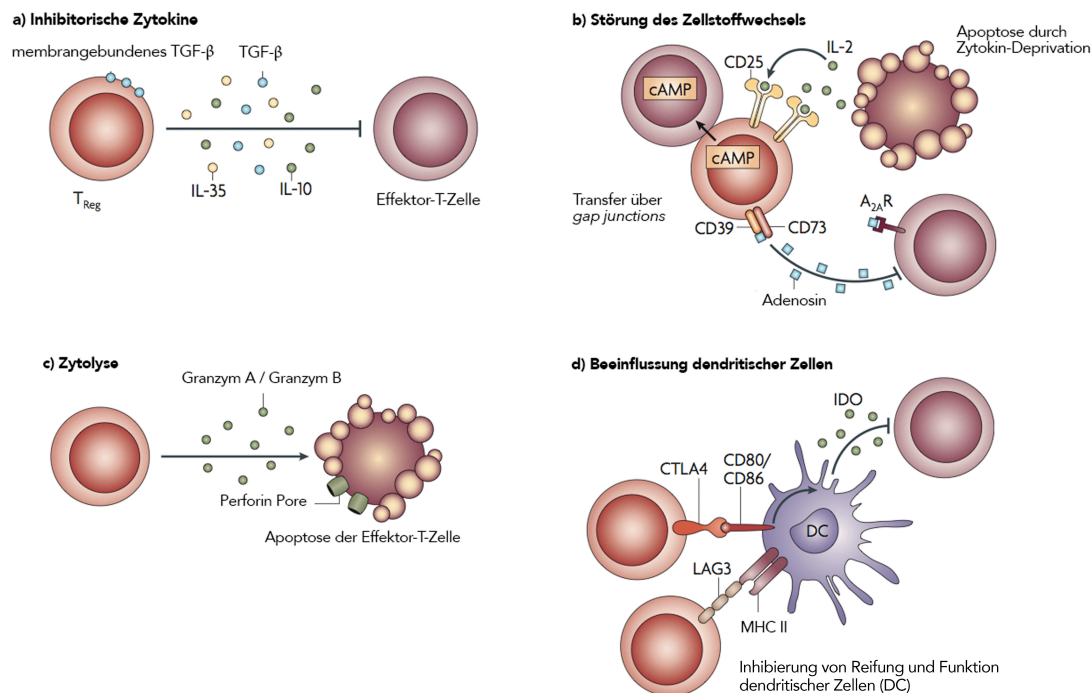


Abb. 1: Suppressionsmechanismen von Treg

Übersichtsbild über Suppressionsmechanismen von Treg. Abkürzungen wie im Fließtext (adaptierte Abbildung aus Review „How regulatory T cells work“, Vignali et. al, Nature Review Immunology, Juli 2008).

1.3 Die allogene Knochenmarktransplantation

Die allogene Knochenmarktransplantation (alloKMT) ist eine kurative Therapieoption für eine Reihe benigner und maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems [61]. Für den Erfolg dieser Therapiemodalität spielen die im Transplantat enthaltenen reifen Spender-T-Zellen eine ambivalente Rolle. Sie fördern das Anwachsen des Transplantats und unterstützen die Immunrekonstitution, nachdem im Rahmen der Konditionierung die patienteneigene Hämatopoese durch Einsatz von Strahlen- und/oder Chemotherapie meist irreversibel geschädigt wurde [62]. Daneben sind sie – neben NK-Zellen – die Akteure des sogenannten *graft-versus-hematopoeisis*-Effektes, der im Falle einer malignen Grunderkrankung als *graft-versus-malignancy*-Effekt (GVM-Effekt) entscheidend zum Therapieerfolg der alloKMT

beiträgt [63-65]. Grundlage des GVM-Effektes sind Unterschiede in Major- und/oder Minor-Histokompatibilitätsantigenen zwischen Spender und Empfänger. Majorantigene bei Mismatchtransplantationen sind Unterschiede im MHC (Maus) bzw. der HLA-Konstellation (Mensch), als Minorantigene (mHA) werden MHC/HLA-präsentierte Peptide polymorpher Proteine bezeichnet. Spender-T-Zellen erkennen diese Unterschiede, werden dem Ausmaß der Disparität entsprechend aktiviert und führen nach der Expansion des reaktiven Klons zur Zerstörung der MHC- oder mHA-exprimierenden Wirtszelle [61]. Über diesen zellvermittelten Immunmechanismus können residuelle hämatopoetische Zellen des Empfängers eliminiert werden, ein Mechanismus der auch maligne hämatopoetische Zellen trifft (*graft-versus-lymphoma/leukemia effect*, GVL). Diese potenten Immunmechanismen machte man sich zunutze, um die Indikation zur allogenen KMT für Patienten zu erweitern, die für myeloablative Konditionierungsprotokolle bis dahin nicht geeignet erschienen. Im Rahmen dieser sogenannten "*reduced-intensity-conditioning*-Protokolle" (RIC-Protokolle) wird die Konditionierungsintensität reduziert und die immunologische Eradikation der Hämatopoese gestärkt, wodurch mittlerweile auch die Transplantation von älteren und komorbiden Patienten möglich ist, für die die Toxizität konventioneller Konditionierungsprotokolle bis dahin eine Kontraindikation darstellte [66].

1.4 GVHD als Hauptkomplikation nach alloKMT

Die immunologischen Grundlagen der gewünschten *graft-versus-hematopoeisis*-Aktivität nach alloKMT erklären im Wesentlichen auch die gravierendste Nebenwirkung, mit der dieses Therapieverfahren assoziiert ist: die GVHD. Hierbei richtet sich die Alloreaktion der Spender-T-Zellen nicht nur gegen die Hämatopoese, sondern auch gegen solide Organe. Ihrer Häufigkeit nach gelten die Haut (81% aller Patienten bei Erstdiagnose), der Darm (54%) und die Leber (50%) als Hauptzielorgane der akuten GVHD [67]. Diese tritt in der Regel innerhalb von 100 Tagen nach alloKMT auf und stellt trotz bedeutender Fortschritte in ihrer Prävention und Behandlung bis heute den führenden Grund für die beträchtliche Morbidität und Mortalität der alloKMT dar, so dass die Indikationsstellung stets individuell streng geprüft werden muss [61, 68, 69].

Billingham formulierte im Jahr 1966 relevante Faktoren für die Entstehung einer GVHD [70]. Es sind dies zum einen immunkompetente Zellen als Bestandteil des Transplantats (Spender-T-Zellen im Knochenmarktransplantat), die Expression von antigenen Strukturen im Wirtsorganismus, welche nicht im Spenderorganismus präsent sind (MHC/Proteinkomplexe bzw. mHA) und zuletzt die Unfähigkeit des Wirtsorganismus das Transplantat abzustößen

(durch die Konditionierung und immunsuppressive Behandlung). Aufgrund der ubiquitären Expression der krankheitsinduzierenden MHC/Proteinkomplexe kann sich die GVHD als Systemerkrankung manifestieren (insbesondere die chronische Form dieser Transplantationskomplikation), wobei die klinische Erfahrung zeigt, dass manche Organsysteme wie z.B. Herz und Niere kaum betroffen sind [71]. Aus pathophysiologischen Überlegungen lässt sich die aGVHD in drei Phasen einteilen.

In der ersten Phase führen Schädigungen des Wirtsorganismus durch die zugrundeliegende Erkrankung, die (An-)Behandlung derselben, Infektionen und toxische Effekte der Konditionierung schon vor der Transfusion der Spender-T-Zellen zu einer Aktivierung von Empfänger-APCs [72]. Diese ist gekennzeichnet durch die Heraufregulierung von MHC/Peptidkomplexen, kostimulatorischen Molekülen sowie der verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen [69]. Vermittelt werden diese Effekte durch *danger signals*: reaktiv freigesetzte Signale der Zellschädigung, wie proinflammatorische Zytokine – allen voran TNF, IL-1 und IL-6 – und Chemokine [69]. Aggravierend wirken Schädigungen an Epithelbarrieren v.a. des Gastrointestinaltrakts, die die Translokation von mikrobiellen Produkten begünstigen, konsekutiv Akteure der angeborenen und erworbenen Immunantwort aktivieren und so einen wichtigen Faktor in dem sich selbst unterhaltenden System der Entzündung bilden [73, 74].

In dem darauffolgenden Schritt werden transplantierte Spender-T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor aktiviert, die unter dem Einfluss von IL-2 und IL-12 proliferieren und zu Effektorzellen differenzieren. Als entscheidendes Immunkompartiment stellten sich für diesen Vorgang die *Peyer's Patches*, sekundäre Immunorgane des Dünndarms, heraus [71]. Die Proliferation von Spender-T-Zellen wird begünstigt durch die Lymphopenie nach myeloablativer Konditionierung [75] und das Ausmaß der MHC-Disparität, die wiederum mit der Frequenz alloreaktiver Spender-T-Zellen korreliert [76]. Tierexperimentelle Studien, in denen die MHC-Konstellationen fein konfiguriert werden können, lieferten Hinweise auf die gewichtige Rolle speziell der MHC-Disparität zwischen aktivierten Empfänger-APCs und Spender-T-Zellen für die Entstehung und die Folgen der GVHD [77, 78]. Abhängig von diversen Faktoren, wie beispielsweise dem Milieu der Aktivierung von Empfänger-APCs, der Art der APC, der Dauer der Interaktion zwischen APC und Spender T-Zelle sowie dem zahlenmäßigen Verhältnis beider Zellpopulationen können Spender-T-Zellen verschieden polarisiert werden, so dass am Ende unterschiedliche Effektor-T-Zellpopulationen die Endstrecke der GVHD-Pathogenese gestalten [72].

In der letzten Phase der GVHD führt die Überaktivität zellulärer Effektoren in einem

hochgradig immundysregulierten Organismus zu profunden Gewebeschäden mit oftmals letalem Ausgang. Insbesondere gastrointestinale Schädigungen führen zur Aufrechterhaltung und Potenzierung der proinflammatorischen Antwort und zur Auslösung eines sog. Zytokinsturms [72]. Die Erklärung hierfür liegt in der hohen Dichte der mikrobiellen Besiedlung der viszerale Hohlorane und der damit verbundenen Endotoxin-Last, welche nach Aufbruch der Epithelbarriere ihre lokal und systemisch entzündungsfördernden Effekte entfalten können und zur weiteren Schädigung der Organbarriere führen. Diese Erkenntnis bildet die Rationale für die therapeutische Entwicklung eines sogenannten "Zytokin-Schilds", welches den Organismus von der schädigenden Wirkung der exzessiv sezernierten Zytokine abschirmen soll und in experimentellen und klinischen Settings vielversprechende Ergebnisse zeigte [74].

Der Beitrag der distinkten Schädigungsmechanismen unterscheidet sich je nach untersuchtem Organsystem. So ergaben sich Hinweise, dass alloaggressive CTL über den Fas-Signalweg für Leberschäden verantwortlich sind, wohingegen die Zelllyse im GI-Trakt präferentiell über Perforine und Granzyme vermittelt wird [69]. Weitere Effektoren in der Endphase der GVHD sind NK-Zellen, Th1 bzw. Th2-Zellen, Makrophagen und andere Zellen der angeborenen Immunität [79].

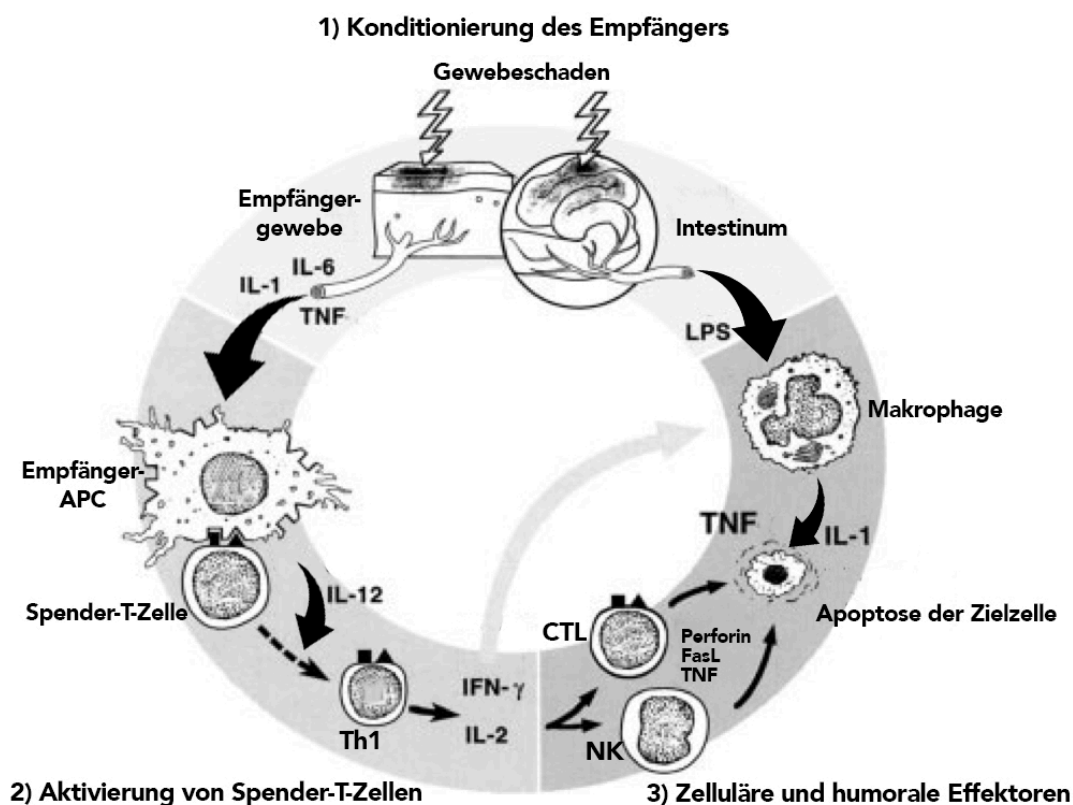


Abb. 2: Pathophysiologie der aGVHD

Übersicht über die drei Phasen in der Pathophysiologie der aGVHD. Abkürzungen wie im Fließtext (adaptierte Abbildung aus „The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation“, Geoffrey et al., Blood, Mai 2000).

1.5 GVHD im murinen Modell

In dem klassischen tierexperimentellen Modell der alloKMT C57BL/6 (H-2^b) → BALB/c (H-2^d) wird GVHD durch den Kotransfer von alloreaktiven Spender-Tconv im Transplantat ausgelöst. Die alleinige Transplantation von Treg löst dabei selbst über komplette MHC-Grenzen keine GVHD aus und deren Beimengung in gleichen Größenordnungen wie Tconv vermitteln einen langanhaltenden Schutz vor der Erkrankung, wie aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bekannt ist [80]. Als entscheidender Mechanismus der GVHD-Prävention konnte die Hemmung der frühen Expansion von alloreaktiven Tconv durch Spender-Treg in den mesenterialen Lymphknoten der transplantierten Tiere identifiziert werden [81, 82]. Da die GVL-Aktivität und andere erwünschte T-Zell-Effekte erhalten bleiben, besteht im adoptiven Treg-Transfer ein vielversprechendes Verfahren, um die Problematik der T-Zell-Ambivalenz aufzulösen [82, 83]. Neben ihrem eindrucklichen Potential, die Entstehung der GVHD zu verhindern, eröffnen positive tierexperimentelle Studien und erste Heilversuche am Menschen die Perspektive, Treg auch auf dem Gebiet der GVHD-Therapie einzusetzen [63]. Als notwendige Voraussetzung hierfür gilt die Überwindung von technischen, medizinrechtlichen und nicht zuletzt finanziellen Hürden.

1.6 Zielsetzung

Adoptiv übertragene Spender-Treg vermitteln einen Schutz vor aGVHD in murinen Modellen der MHC-differenten alloKMT und die Einbringung eines Treg-depletierten Transplantats aggraviert die Ausprägung der sich entwickelnden aGVHD bei einem sonst identischen Versuchsaufbau [80]. Treg sind unentbehrlich für die Aufrechterhaltung peripherer Toleranz unter physiologischen Bedingungen, so dass die erfolgreiche Regeneration dieses Kompartiments auch nach KMT von vitaler Bedeutung sein muss [84, 85]. Noch weitgehend ungeklärt ist die Bedeutung von spenderstämmigen Treg in der Rekonstitutionsphase nach alloKMT. Um diese Frage zu adressieren, sollen Spender-Treg nach erfolgreicher KMT in einem MHC-differenten Transplantationsmodell eliminiert und die Auswirkungen auf das Überleben sowie die Effekte auf Organebene untersucht werden.

Dabei soll die Manipulation der Empfänger in zwei unterschiedlichen Phasen der Rekonstitution stattfinden. Zum einen zu einem Zeitpunkt, an dem bereits ein nahezu vollständiger Spenderchimärismus vorliegt, zum anderen im frühen Stadium des *engraftments* der Spenderhämatopoese. In der Zeit nach alloKMT sollen das Verhalten, Gewicht und Aussehen der Versuchstiere engmasching erfasst werden (klinischer GVHD-Score). Zum Analysezeitpunkt an d14/15 nach Spender-Treg-Depletion (entsprechend d19/20 bzw. d39/40 nach alloKMT) sollen verschiedene Gewebe einer multimodalen Analyse zugeführt werden. Feingewebliche Veränderungen des Intestinums, dem bei der Initiation und Propagierung der aGVHD eine entscheidende Rolle zukommt [74], sollen durch konventionelle Histologie und Spezialfärbungen erfasst werden. Außerdem soll mittels qRT-PCR das Zytokinmilieu im Darm charakterisiert werden. Der Schwerpunkt der Untersuchungen wird die durchflusszytometrische Analyse des zellulären Kompartiments wichtiger Immunorgane (Milz, Knochenmark, periphere und mesenteriale LK) und des Darms bilden. Eine Übersicht über die beiden Versuchsabläufe gibt das nachfolgende Schema.

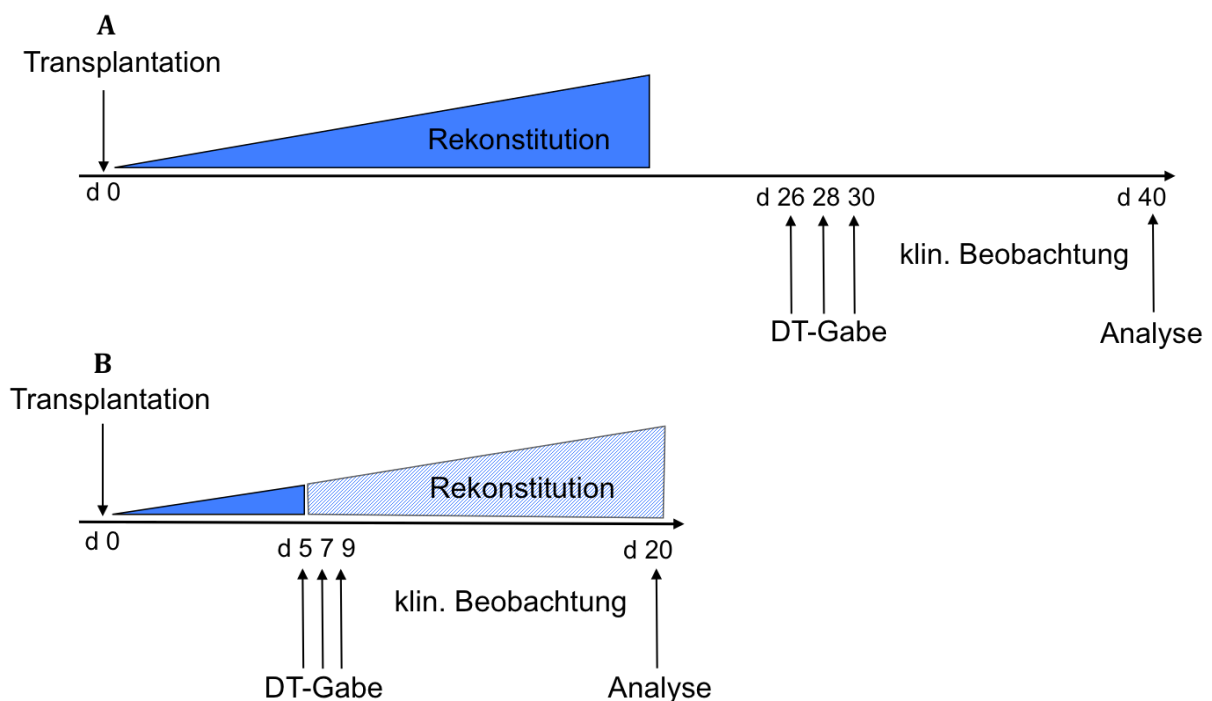


Abb. 3: Schematische Übersicht über die Versuchsabläufe

In beiden Ansätzen erhalten BALB/c-Mäuse ($H-2^d$) nach Konditionierung $2,5 \times 10^6$ Gesamt-Knochenmarkszellen von unbehandelten *Foxp3-DTRgfp*-Tieren ($H-2^b$). In einem ersten Setting (A) wird einem Teil der Tiere nach hämatopoetischer Rekonstitution durch intraperitoneale DT-Gabe ($0,5 \mu\text{g}$) an d26, 28 und 30 das Spender-Treg-Kompartiment eradiziert und verschiedene Organe an d39 und 40 einer detaillierten Untersuchung zugeführt (im Folgenden „Langzeit“). In einem zweiten Ansatz (B) werden Spender-Treg einem Teil identisch konditionierter und

transplanterter Versuchstiere noch innerhalb der Rekonstitutionsphase depletiert (im Folgenden „Kurzzeit“). An d19 und 20 werden analog zum Aufbau „A“ Organe entnommen und multimodale Analysen durchgeführt. Alle Tiere werden über den gesamten Versuchszeitraum nach einem etablierten GVHD-Score bewertet. Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit werden die Experimente mindestens einmal wiederholt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Produkt	Hersteller, Standort, Land
β -Mercaptoethanol (50 μ M)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (1x, 20x)	Appllichem, Darmstadt, D
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Tabletten	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Agarose	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Ammoniumchlorid (NH ₄ CL)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Citronensäuremonohydrat	Merck, Darmstadt, D
DAPI (1ng/ml)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
DEPC	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
DTT (1M)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
EDTA-Dinatriumsalz (0,1 mM)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
HCL (1 N)	Roth, Karlsruhe, D
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm, D
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
NaOH (1 N)	Roth, Karlsruhe, D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe, D
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
Trypsin EDTA (0,05 %/0,02 %)	PAN, Aidenbach, D
Wasserstoffperoxid (30 %)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA

2.1.2 Histologische Puffer, Färbereagenzien und Medien

Produkt	Hersteller, Standort, Land
Antibody Diluent anti-mouse/rat Foxp3	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Anti-mouse/rat Foxp3 purified (primär AK)	eBioscience, Frankfurt, D
Entellan-Eindeckmedium	Merck, Darmstadt, D
Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Eukitt-Eindeckmedium	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Citratedukt A	2,1g Citronensäuremonohydrat + 100ml aqua bidest
Citratedukt B	29,41g tri-Natriumcitrat-Dihydrat + 1l aqua bidest
Citratpuffer	1ml Citratedukt A + 49ml Citratedukt B + 450ml aqua bidest, pH einstellen auf 7,2
DAB-Kit	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Peroxidase-Block	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Hämatoxylin-Lösung	Merck, Darmstadt, D
Histofine simple-stain mouse MAX PO (rat) (sekundär AK)	Medac, Wedel, D
Waschpuffer (1x)	900ml Waschpuffer-konzentrat (10x) + 100ml aqua bidest
Waschpuffer-Konzentrat (10x)	Agilent, Santa Clara, CA, USA

2.1.3 Zellbiologische Medien, Puffer und Lösungen

Produkt	Hersteller, Standort, Land / Ingredienzien
ACK-Puffer (6x)	0,155M NH_4Cl + 0,1 M KHCO_3 + 0,1 mM EDTA-Dinatriumsalz + 500ml aqua bidest auf pH 7,3, 0,2µm sterilfiltriert
DMEM	PAN Biotech, Aidenbach, D
DMEM-Verdau-Ansatz	10ml DMEM-Medium + 25µl DNase I

	(10mg/ml) + 2,5 Liberase (5mg/ml)
DNase I (DNase I from bovine pancreas, 10mg/ml)	Roche, Basel, CH
FACS-Clean	BD, Heidelberg, D
FACS-Flow	BD, Heidelberg, D
FACS-Puffer	PBS + 2% FCS
FACS-Rinse	BD, Heidelberg, D
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA
Fixierungs- und Permeabilisierungskit	BD, Heidelberg, D
Foetal calf serum (FCS)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
HBSS (1x, 10x)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
HBSS / EDTA	500ml HBSS-Puffer (1x) + 5ml EDTA (0,5M)
HEPES-Puffer (1 M)	PAN, Aidenbach, D
Liberase (medium thermolysin concentration, 5mg/ml)	Roche, Basel, CH
L-Glutamin (Lsg., 200 mM)	PAA, Pasching, A
MACS-Puffer (entgast)	500ml PBS + 5ml FCS + 2mM EDTA
MOPS-Puffer (1x, 20x)	Applichem, Darmstadt, D
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA, Pasching, A
Percoll-Stock	GE Healthcare, Uppsala, SWE
100% Percoll	50ml Percoll-Stock + 4,33ml HBSS-Puffer (10x) + 500µl HEPES-Puffer (1M) + 220µl HCL (1M)
75% Percoll	1,5ml 100% Percoll + 0,5ml HBSS (1x)
45% Percoll	3,6ml 100% Percoll + 4,4ml HBSS (1x)
30% Percoll 30%	3ml 100% Percoll + 7ml HBSS (1x)
Permeabilisierungspuffer (10x)	eBioscience, Frankfurt, D
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin, Pen/Strep)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
Phosphat-Citrat-Puffer (PCP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin)	Lonza, Verviers, BE

5% RPMI-Medium	500ml RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin) + 25ml FCS + 5ml Pen/Strep
10% RPMI-Medium	500ml RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin) + 50ml FCS + 5ml Pen/Strep
RPMI / β -ME-Medium	500ml 10% RPMI-Medium + 5 ml Pen/Strep+ 500 μ l β -ME
RPMI / HEPES-Medium	500ml RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin) + 10ml FCS + 10ml HEPES (1M) + 5ml Pen/Strep
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Türcks-Lösung	Merck, Darmstadt, D

2.1.4 Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller, Standort, Land
B220	IgG2a	RA3-6B2	Ratte	PB	BD, Heidelberg, D
Biotin	IgG1	Bio3-18E7	Maus	APC, PerCP, PB	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
CD4	IgG2a	RM4-5	Ratte	APC, PE, PE-Cy7	BioLegend/Biozol, Eching, D
CD4	IgG2a	RM4-5	Ratte (DA)	PerCP, PB	BD, Heidelberg, D
CD8 α	IgG2a	53-6.7	Ratte (LOU/Ws1/M)	PerCP	BD, Heidelberg, D
CD8 α	IgG2a	53-6.7	Ratte (LOU/Ws1/M)	APC	BD, Heidelberg, D
CD8 α	IgG2a	53-6.7	Ratte (LOU/Ws1/M) Ratte (Lew)	PE-Cy7	BD, Heidelberg, D
CD8 β	IgG1	53-5.8	Ratte	PB	eBioscience, Frankfurt, D
CD11b	IgG2b	M1/70	Ratte (DA)	PE-Cy7	BD, Heidelberg, D

CD16/CD32	IgG2a	93	Ratte	purified	BD, Heidelberg, D
CD19	IgG2a	1D3	Ratte (Lew)	PE-Cy7	BD, Heidelberg, D
CD19	IgG2a	6D5	Ratte	PE, PB	BioLegend/Biozol, Eching,
CD25	IgG1	PC61	Ratte	PE	BD, Heidelberg, D
CD25	IgG1	PC61	Ratte	APC	BioLegend/Biozol, Eching, D
CD25	IgG1	PC61. 5	Ratte	PE-Cy7	eBioscience, Frankfurt, D
CD45	IgG2b	30F- 11	Ratte (LOU/Ws1/M)	APC-Cy7, PE	BD, Heidelberg, D
Foxp3	IgG2a	FJK- 16s	Ratte	FITC, PE	eBioscience, Frankfurt, D
Gr-1	IgG2b	RB6- 8C5	Ratte	APC	BD, Heidelberg, D
H-2K ^b	IgG2a	AF6- 88.5	Maus (B12B/c)	Biotin, PE	BioLegend/Biozol, Eching, D
Ki-67	IgG2a	So/A1 5	Ratte	APC	eBioscience, Frankfurt, D
Ly6C	IgG2c	HK1.4	Ratte	PB	BioLegend/Biozol, Eching, D
Ly6G	IgG2a	1A8	Ratte (Lew)	PE	BD, Heidelberg, D
NK1.1	IgG2a	PK136	Maus	APC	BioLegend/Biozol, Eching, D
TCR β	IgG2b	H57- 597	Armenischer Hamster	APC, PE, PE- Cy7, PB	BD, Heidelberg, D
TCR $\gamma\delta$	IgG	GC3	Armenischer Hamster	APC	eBioscience, Frankfurt, D
TER-119	IgG2b	TER- 119	Ratte	APC	BioLegend/Biozol, Eching, D

2.1.5 Magnetische *beads* zur Zellseparation

Spezifität	Hersteller, Standort, Land
Anti-CD45 <i>microbead</i>	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D

2.1.6 Molekularbiologische Reagenzien und Kits

Produkt	Hersteller, Standort, Land
Brilliant III Ultra Fast qPCR Master Mix	Agilent, Santa Clara, CA, USA
dNTPs	Promega, Mannheim, D
RNA-Farbstoffgemisch für Gelelektrophorese	10ml Formamid (50%) + 3,5ml Formaldehyd (37%) + 1ml MOPS (20x) + 0,8ml Bromphenolblau (1% in aqua) + 2ml Ficoll 400 (1%) + 2,7ml DEPC-Puffer + 1mg Ethidiumbromid
M-MLV Reverse Transkriptase RNase H-	Promega, Mannheim, D
Random Hexamere	Promega, Mannheim, D
M-MLV Reverse Transkriptase RNase H-Puffer (5x)	Promega, Mannheim, D
2% RNAlater	Ambion, Carlsbad, CA, USA
RNeasy mini Kit	Qiagen, Hilden, D
DNase I (100U/ml)	Roche, Mannheim, D
RNasin	Promega, Mannheim, D

2.1.7 cDNA-Primer für qRT-PCR-Analysen

Alle verwendeten cDNA-Primer stammen von Eurofins Genomics, Ebersberg, D.

Gen	Sequenz (5' nach 3')
mFoxp3 (KD) Sense	CCCATCCCCAGGAGTCTTGC (20)
mFoxp3 (KD) Antisense	ACCATGACTAGGGGCACTGTA (21)
mGAPDH (KD2) Sense	GCACAGTCAAGGCCGAGAAT (20)
mGAPDH (KD2) Antisense	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA (20)

HPRT Sense	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC (25)
HPRT Antisense	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC (25)
mIL-6 Sense	GAGGATAACCACTCCCAACAGACC (23)
mIL-6 Antisense	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA (24)
mIL-10 Sense	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA(20)
mIL-10 Antisense	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT (20)
mIL-17 Sense	GCTCCAGAAGGCCCTCAGA (19)
mIL-17 Antisense	AGCTTTCCCTCCGCATTGA (19)
mIL-22 (KD) Sense	TTTCCTGACCAAACCTCAGCA (20)
mIL-22 (KD) Antisense	TCTGGATGTTCTGGTCGTCA (20)
mINF- γ Sense	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA (24)
mINF- γ Antisense	TGGCTCTGCAGGATTTTCCATG (21)
mMIP-2 Sense	GGCTGTTGTGGCCAGTGAA (19)
mMIP-2 Antisense	GCTTCAGGGTCAAGGCAAAC (20)
mCCL-2 Sense	GCCTGCTGTTACAGTTGCC (20)
mCCL-2 Antisense	AGCCTACTCATTGGGATCATCTTGCT (26)
mREG3- γ (JF) Sense	ATGGCTCCTATTGCTATGCC (20)
mREG3- γ (JF) Antisense	GATGTCCTGAGGGCCTCTT (19)
mTNF Sense	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA (25)
mTNF Antisense	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC (23)

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller, Standort, Land
5 ml FACS-Röhrchen steril oder unsteril	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ, USA
96-well-PCR-Platte	Eppendorff, Hamburg, D
Deckgläser (24x40 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach, D
Einmalpipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Corning/Costar, NY, USA
Einmalskalpell Nr. 10	Feather, Osaka, JPN
FACS-Röhrchen (5ml, unsteril)	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Pipettenspitzen aroject (10 μ l)	Ratiolab, Asslar, D

Glaspipetten	VWR, Rednor, PA, USA
GentleMACS C-Tube	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
Gewebeschwamm	Labonord, Mönchengladbach, D
Kanülen (0,4, 0,9 mm)	BD, Heidelberg, D
Kombitips	Eppendorf, Hamburg, D
Objektträger Superfrost	Thermo scientific, Braunschweig, D
Petrischalen (100x15 mm)	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Polypropylenröhrchen (15ml, 50ml)	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ, USA
QIAshreddersäule	Qiagen, Hilden, D
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2ml)	Eppendorf, Hamburg/Sarstedt, Nürnberg, D
Spritzen (1, 10 ml)	BD, Heidelberg, D
Zellsiebe (70, 100 µm)	Falcon/BD, Heidelberg, D

2.1.9 Geräte

Produkt	Hersteller, Standort, Land
Autoklav Varioklav 75SCompact	H+P, Oberschleißheim, D
AutoMACS	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, D
BD™ LSR II Durchflusszytometer	BD, Heidelberg, D
Gefrierschränke (-20, -80°C) Privileg	Bosch, Stuttgart, D
Gentle-MACS	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, D
Heizblock HBT-2131	Heap Labor Consult, Bovenden, USA
Inkubatoren	Heraeus, Hanau, D
LightCyclerII	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Linearbeschleuniger Primus 2	Siemens, München, D
Megafugen Zentrifuge	Heraeus, Hanau, D
Mikrotom Frigucot 2800-E	Reichert Jung, Wetzlar, D
NanoDrop ND-1000	PeQlab, Erlangen, D
Zellauszählungs-Mikroskop Eclipse TS100	Nikon, Tokio, J

Pipettenspitzen (-10, -100, -1000µl)	Eppendorff, Hamburg, D
Realplex	Eppendorff, Hamburg, D
Sterilbank SH18, KS15	Heraeus, Hanau, D
Thermocycler PTC-200	MJI Research, Waltham, MA, USA
Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau, D
TissueFAXS-Mikroskop Zeiss-Oberserver.Z1	Zeiss, Oberkochen, D
Typhoon 9200 Variable Mode Imager	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Waage L1200S	Sartorius, Göttingen, D

2.1.10 Versuchstiere

Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse im Alter zwischen 6 und 10 Wochen verwendet.

Mausstamm	Herkunft, Standort, Land
BALB/c (H-2 ^d)	Charles River, Sulzbach, D
Foxp3DTRgfp (H-2 ^b) [84]	Eigenzucht

2.1.11 Software und Internetdienste

Name	Hersteller, Standort/Adresse, Land
Adobe Reader	Adobe, San Jose, USA
BD FACS Diva	BD, San Jose, USA
Endnote X7	Thomson Reuters, New York City, USA
FlowJo Version 8.8.6	Treestar Inc., Ashland, USA
ImageQuant Version 5.2	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
HistoQuest	TissueGnostics GmbH, Wien, A
Microsoft Office 2011	Microsoft, Redmond, USA
NanoDrop 1000 Version 3.7.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pubmed Medline	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

Megaplex ep Realplex	Eppendorff, Hamburg, D
Sigma Plot	Systat Software Inc, San Jose, USA
TissueFAXS	TissueGnostics GmbH, Wien, A

2.2 Methoden

2.2.1 Allogene Knochenmarktransplantation im murinen Modell

2.2.1.1 Konditionierung und Transplantation

Nach letaler Bestrahlung der Empfänger (BALB/c-Weibchen, H-2^d) mit der Energiedosis 9 Gy am Linearbeschleuniger Primus 2 (100cGy/min) wurden die Versuchstiere noch am selben Tag mit $2,5 \times 10^6$ KMges-Zellen (Foxp3DTRgfp-Weibchen, H-2^b) transplantiert. Die Zellgabe erfolgte durch Injektion des in 300µl RPMI/5% FCS resuspendierten Transplantats in die Schwanzvene. Einen Überblick über das Transplantationsschema gibt nachfolgende Abbildung.

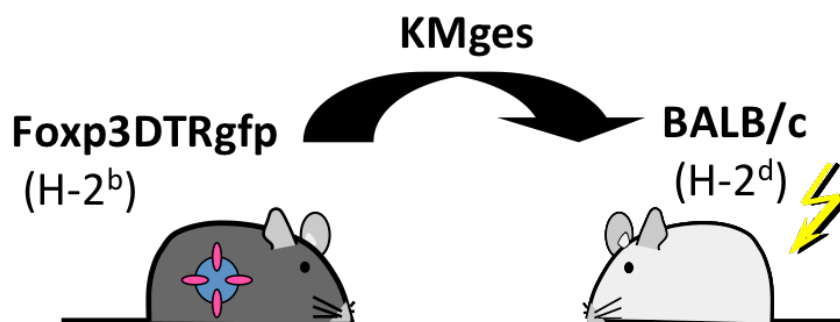


Abb. 4: Allogenes Transplantationsmodell

In den durchgeführten Experimenten erhielten BALB/c (H-2^d) nach letaler Bestrahlung mit 9 Gy 2,5Mio Gesamt-Knochenmarkzellen (KMges) von Foxp3DTRgfp-Spendern (H-2^b) (Schema der Arbeitsgruppe).

2.2.1.2 In vivo Depletion von spenderstämmigen Treg

Der Inzuchtstamm Foxp3DTRgfp exprimiert ein Fusionsgen, welches unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors transkribiert wird und neben Foxp3 für den hochaffinen humanen

Diphtherietoxinrezeptor (*DTR*) und ein grün fluoreszierendes Reporterprotein (*gfp*) kodiert. Durch diesen *knock in* wird zum einen die Detektion von Foxp3-exprimierenden Treg durch optische Verfahren, zum anderen ihre gezielte Elimination durch intraperitoneale Applikation von 0,5µg Diphtherietoxin (DT) ermöglicht [84]. Auswirkungen auf andere Zellen sind nach Applikation von DT nicht zu erwarten, weil sich das murine Analog des humanen DTR aufgrund eines Aminosäureaustausches in einer nicht-konservierten-Genregion durch eine wesentlich geringere Affinität zu seinem Liganden auszeichnet und Mäuse deshalb als intrinsisch resistent gelten [86]. Weiterhin wird in der Maus Foxp3 nur in Treg exprimiert, wodurch in der Foxp3DTRgfp-Maus auch nur Treg *gfp* und den humanen DTR aufweisen [11, 84].

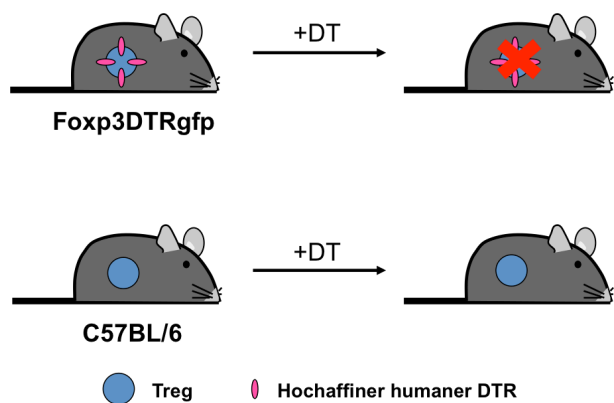


Abb. 5: Schema der DT-vermittelten Treg-Depletion

In der Foxp3DTRgfp-Maus wird ein Fusionsprotein bestehend aus dem hochaffinen humanen Diphtherietoxinrezeptor (*DTR*) und einem grün fluoreszierenden Protein (*gfp*) unter der Kontrolle des Treg spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 exprimiert. Die Verabreichung von Diphtherietoxin (DT) führt in transgenen Mäusen zur selektiven Depletion von Treg. In Wildtyp-Mäusen bleibt die Manipulation folgenlos. (Schema der Arbeitsgruppe)

2.2.1.3 Beurteilung der äußeren Erscheinung (GVHD Score)

Zur Beurteilung der äußeren Erscheinung der transplantierten Versuchstiere wurden zweimal wöchentlich Inspektionen durchgeführt und der Gesundheitszustand anhand des etablierten GVHD-Scores nach Cooke *et al.* semiquantitativ berechnet [87]. Dieses Testsystem berücksichtigt Manifestationen an der Haut und dem Fell, bewertet die Körperhaltung und erfasst Aktivität und Gewicht der Mäuse. Pro untersuchter Kategorie werden je nach Ausprägung im Halbpunktabstand bis zu zwei Punkte vergeben. Gemäß den an der Universität Regensburg geltenden Tierschutzrichtlinien wurden Tiere beim Überschreiten eines Punktwerts von sechs oder bei einem Gewichtsverlust > 25% getötet.

	Haut	Fell	Körperhaltung	Aktivität	Gewicht
0.5	Schuppung an Pfote und Ohren	struppiges Fell ventral	leichte Kyphose, nur in Ruhe	Aktivität reduziert	-
1.0	Erythem an Schwanz und Anus	ventrale Querlinien, leicht struppiges Fell dorsal	leichte Kyphose auch bei Bewegung	>50% des Beobachtungszeitraums um keine Bewegung	10-25% Gewichtsverlust
1.5	offene Läsion	Struppiges Fell >50% der Oberfläche	Kyphose	Bewegung nur nach Stimulation	-
2.0	multiple offene Läsionen	Gesamtes Fell betroffen, Fellverlust	starke Kyphose, eingeschränkte Beweglichkeit	keine Bewegung, auch nach Stimulation	>25% Gewichtsverlust

Tab. 1: Semiquantitativer aGVHD-Score nach Cooke *et al.*

Das etablierte Beurteilungssystem nach Cooke *et al.* erlaubt die Einordnung der GVHD-Schwere im murinen Modell durch Vergabe von maximal zwei Punkten je betrachteter Kategorie.

2.2.1.4 Durchflusszytometrische Überwachung der Blutzusammensetzung

Über die durchflusszytometrische Analyse peripheren Bluts wurde in Versuchen mit ausreichend langer Beobachtungszeit an d21 und teilweise zu späteren Zeitpunkten die zelluläre Blutzusammensetzung untersucht und das Anwachsen des Transplantats überwacht. Dazu wurde die laterale Schwanzvene nach vorheriger Gefäßrelaxation durch Infrarotbestrahlung mit einem Skalpell eröffnet und wenige Tropfen Blut in einem heparinisierten Puffer (10µl Heparin + 4ml PBS) aufgefangen. Die Proben wurden bei 4°C für 6 Minuten bei 1200rpm abzentrifugiert und die Überstände vorsichtig abgesaugt. Erythrozyten wurden durch Zugabe von 1ml ACK-Puffer (1x) auf dem Vortexer und Inkubation für 5-8 Minuten lysiert. Nach 2 Waschschritten mit PBS (1200rpm, 4°C, 10 Minuten) wurden die gesäuberten Leukozyten in FACS-Puffer aufgenommen und linienspezifische Oberflächenantigene mit fluoreszenten Antikörpern gefärbt.

2.2.1.5 Tötung und Organentnahme

Die Versuchstiere wurden am Kopf fixiert und durch axialen Zug am Schwanz durch zervikale Dislokation getötet. Alternativ kam die CO₂-Begasung zum Einsatz. Nach Eintritt des Todes wurden die Mäuse mit Ethanol 75% getränkt und zügig aufgearbeitet.

Axilläre, inguinale und mesenteriale Lymphknoten sowie Milz und die beiden Femura wurden für die spätere durchflusszytometrische Analyse in RPMI-Medium 5% eingelegt und auf Eis gestellt. Dick- und Dünndärme wurden abhängig von der jeweiligen Fragestellung unterschiedlich behandelt:

Gewebe für zellbiologische Untersuchungen wurden in ihrer Gesamtheit der Länge nach eröffnet, in RPMI/HEPES-Medium geschwenkt und die makroskopisch als flächige Erhebungen imponierenden *Peyer's Patches* des Dünndarms tangential abgetragen. Die Organe wurden anschließend in neuen Gefäßen mit RPMI/HEPES auf Eis gelagert und im Labor weiter bearbeitet.

Waren die gastrointestinalen Gewebe zur histologischen Untersuchung vorgesehen, wurden jeweils die orale Hälfte des Dünndarms und die aborale Hälfte des Dickdarms in 5% RPMI-Medium überführt und intraluminales Material durch gerichteten externen Druck ausgestrichen. Die Organe wurden sodann spiralig aufgewickelt, in gepolsterten Einlegekassetten eingelegt und in Formalin fixiert. Die weitere feingewebliche Prozessierung erfolgte im Anschluss teils durch Frau Dr. Huber aus der Pathologie, teils durch die eigene Arbeitsgruppe.

Die überbleibenden intestinalen Gewebe (aborale Hälfte des Dünndarms und orale Hälfte des Dickdarms) wurden für molekularbiologische Verfahren eingesetzt. Dazu wurden die Organe axial eröffnet, in mit 5% RPMI-Medium gefüllten Petrischalen gereinigt und im Anschluss in neuen Gefäßen mit 2% RNAlater eingelegt.

2.2.2 Zellbiologische Verfahren

2.2.2.1 Leukozytenisolierung aus der Milz

Aseptisch entnommene Milzen wurden unter der Sterilbank in einer mit 5% RPMI-Medium gefüllten Petrischale von anhaftendem Binde- und Fettgewebe befreit. Anschließend wurde das Organ in einer neuen, mit 5ml 5% RPMI-Medium gefüllten Petrischale an einem Pol eröffnet und das Parenchym durch Druck vorsichtig in Lösung gebracht. Die entleerte Milzkapsel wurde verworfen. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer 5ml Pipette wurde eine homogene Zellsuspension hergestellt und das gewonnene Material über einen 70µm Zellsieb in ein neues Gefäß überführt. Zweimaliges Spülen der verwendeten Petrischale mit 5% RPMI-Medium verringerte den Verlust an extrahierten Zellen. Die

Ansätze wurden auf 50ml mit 5% RPMI-Medium aufgefüllt und durch Zentrifugation (1200rpm, 10 Minuten, 4°C) am Boden des Gefäßes verdichtet.

Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet nach Zugabe von 2ml 5% RPMI-Medium durch behutsames Pipettieren wieder aufgelockert und mit 3ml ACK-Puffer (1x) versetzt. Zur besseren Wirksamkeit des zugesetzten Lysepuffers wurde der Ansatz kurz gevortext und anschließend für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Hämolyse durch Auffüllen des Reaktionsansatzes mit 10% RPMI-Medium auf 50ml abgebrochen und die Zellen abzentrifugiert (1200rpm, 10 Minuten, 4°C). Abhängig von der Vollständigkeit der Hämolyse wurde der Ansatz ein weiteres Mal mit ACK-Puffer (1x) behandelt. Nach Absaugen des rötlichen Überstandes wurde durch die Zugabe von 1ml FACS-Puffer eine Zellsuspension hergestellt und zur mikroskopischen Zellzählung eingesetzt.

2.2.2.2 Leukozytenisolierung aus dem Knochenmark

Zur Gewinnung des Knochenmarks wurde die *in toto* entnommene hintere Extremität des Versuchstiers ohne Frakturierung der Kompakta vom umgebenden Muskelgewebe freipräpariert. Anschließend wurden die proximalen und distalen Enden des blanken Femur und der Tibia mit einer Schere unter aseptischen Bedingungen abgetrennt und die Markhöhlen mit 5% RPMI-Medium in eine mit selbigem Medium benetzte Petrischale ausgeschwemmt. Dazu verwendeten wir eine 10ml Spritze mit einer feinen 27-Gauge-Kanüle. Die Knochenmarkzellen wurden sodann durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 5ml Pipette vereinzelt und über ein 70µm Zellsieb in ein neues Gefäß überführt. Die Petrischale wurde 2-malig mit 5% RPMI-Medium gespült und ebenfalls auf das Zellsieb pipettiert. Die gewonnenen Proben durchliefen im Anschluss die für die Aufarbeitung der Milzzellen (siehe oben) beschriebenen Schritte und wurden am Ende in der Neubauer-Zählkammer quantifiziert.

2.2.2.3 Leukozytenisolierung aus den Lymphknoten

Die entnommenen Lymphknoten wurden unter der Sterilbank von anhaftenden Geweberesten befreit. Anschließend wurden die axillären, inguinalen und mesenterialen Lymphknoten einer jeden Maus gepoolt und mit dem Stempel einer dünnen Spritze durch ein mit 5% RPMI-

Medium benetztes 50µm Zellsieb in ein neues Gefäß passiert. Das Sieb wurde mehrfach mit 5% RPMI-Medium gespült um die Zellausbeute zu maximieren.

Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1200rpm, 6 Minuten, 4°C), der Überstand abgesaugt und kleine Volumina des in 1ml FACS-Puffer resuspendierten Zellpellets zur Auszählung eingesetzt.

2.2.2.4 Leukozytenisolierung aus dem Dick- und Dünndarm

Durch ein spezielles Aufarbeitungsverfahren war es möglich zwei Kompartimente getrennt voneinander zu betrachten. In einem ersten Schritt wurden intraepitheliale Lymphozyten (IEL) aus dem einschichtigen Deckepithel der Darmschleimhaut isoliert. Durch weitere enzymatische und thermisch-mechanische Verdauschritte wurde schließlich der Verbund der darunterliegenden Lamina Propria aufgebrochen und die darin befindlichen Lymphozyten (Lamina Propria Lymphozyten, LPL) extrahiert.

2.2.2.4.1 Isolierung von intraepithelialen Lymphozyten

Zunächst wurden die Därme in den Transportgefäßen geschüttelt um restlichen Schleim abzulösen. Anschließend wurden sie auf ein Alusieb überführt und mit kaltem PBS gespült. Die gereinigten Därme wurden daraufhin mit der Schere in ca. 5mm lange Stückchen zerteilt und in ein neues Gefäß mit 13ml warmen HBSS/EDTA und 13µl frisch zugegebenen DDT überführt. Durch eine 20 minütige Inkubation bei 37°C und beständigem Schwenken werden die interzellulären Haftkontakte durch EDTA vermittelte Komplexierung der dafür notwendigen Ca^{2+} -Ionen aufgelöst, während DTT als mildes Reduktionsmittel oxidativen Zellschaden minimieren sollte. Anschließend wurden die Reaktionsansätze in 50ml Tubes überführt und auf ein Volumen von 30ml aufgefüllt. Durch starkes Schütteln für 10 Sekunden wurde die Epitheliolyse forciert. Die auf diese Art ausgelösten IEL wurden über ein 100µm Zellsieb in ein neues 50ml Tube gefiltert und auf Eis zwischengelagert.

Dieser als „Vorverdau“ bezeichnete Vorgang wurde zur Optimierung der Zellausbeute wiederholt. Zum Schluss wurden die zellulären Bestandteile des Vorverdaus durch Zentrifugation bei 1500rpm bei 4°C für 10 Minuten vom Überstand getrennt und das entstandene Pellet zur weiteren Aufreinigung in 1ml 45% Percoll in Lösung gebracht.

Dazu wurde die Zellsuspension mit weiteren 3ml 45% Percoll versetzt und die Suspension in ein neues 15ml Gefäß überführt. Eventuell zurückbleibende Zellen wurden in weiteren 4ml 45% Percoll aufgenommen und mit den anderen Zellen vereint. Anschließend wurde durch vorsichtiges Unterschichten mit 2ml 75% Percoll eine zweite Phase eingebracht und die Reaktionsansätze bei 2500rpm und Raumtemperatur für 20 Minuten ohne Bremse abzentrifugiert, wodurch eine Trennung der enthaltenen Bestandteile erreicht wurde.

IEL wurden durch vorsichtige Aspiration des interphasischen Zelniederschlags mit einer Glaspipette gewonnen. Der Zellertrag wurde in 30ml Medium in einem neuen Gefäß gewaschen, bei 1500rpm und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert, am Mikroskop quantifiziert und für durchflusszytometrische Untersuchungen auf Eis zwischengelagert.

2.2.2.4.2 Isolierung von Lamina Propria Lymphozyten

Die im Vorverdau anfallenden Gewebsfragmente wurden zur Isolation von LPL weiter bearbeitet. Zunächst erfolgte ein Waschschrift in einem neuen Gefäß, bei dem das Gewebe in 30ml HBSS für 30 Sekunden leicht geschüttelt wurde. Der Überstand wurde über einem Alusieb abgeschüttet und die aufgefangenen Darmstückchen mit HBSS nachgespült.

500µl DMEM-Verdau-Ansatz wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und die gesäuberten Gewebestückchen mit einer Schere mechanisch homogenisiert. Nach dieser Vorbehandlung wurden die Proben in neue Tubes mit weiteren 9,5ml DMEM-Verdau-Medium überführt und unter kontinuierlichem Schwenken bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Der Verdauansatz wurde anschließend in ein Gentle-MACS C-Tube übertragen und im Programmmodus „*m_intestine_01*“ weiter aufgeschlüsselt.

Nach einer 3 minütigen Zentrifugation bei 1300rpm konnte der Überstand dekantiert werden und das in 1ml RPMI/β-ME-Medium resuspendierte Pellet über ein 100µm Zellsieb in ein neues 50ml Tube gefiltert werden. Anschließend wurde das Sieb mit weiteren 10ml RPMI/β-ME-Medium gespült und das Filtrat mit dem gleichen Medium auf 30ml Endvolumen aufgefüllt. Abschließend wurden die Zellen zweimal durch 10 minütige Zentrifugation mit 1500rpm bei 4°C in Medium gewaschen.

Danach wurde eine Anreicherung auf CD45⁺ Leukozyten mit dem AutoMACS durchgeführt. Hierzu wurden die aus dem Verdau gewonnenen Zellpellets in 225µl MACS-Puffer resuspendiert, anschließend 25µl anti-CD45-*beads* zugegeben und der Ansatz behutsam gevortext. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei 4°C wurde der Ansatz in ein vorbereitetes

FACS-Tube transferiert. Durch Spülen des Inkubationsgefäßes mit MACS-Puffer wurde die Zellsuspension auf 1ml eingestellt. Im Programmmodus „POSSEL“ wurde die CD45⁺ Fraktion angereichert und in ein neues FACS-Röhrchen gefüllt.

Teilweise wurde alternativ zum beschriebenen Verfahren eine Aufreinigung durch dichtegestützte Trennung mit Percoll (siehe Kapitel 2.2.2.4.1 Isolierung von intraepithelialen Lymphozyten) vorgezogen. Die gewonnenen Zellen wurden abschließend unter dem Mikroskop quantifiziert.

2.2.2.5 Quantifizierung isolierter Zellen

Für die Auszählung von Leukozyten der extraintestinalen Organe (Milz, Knochenmark, Lymphknoten) wurden mit Türck'scher Lösung definierte Mischverhältnisse eingestellt und kleine Volumina unter das gereinigte Deckplättchen einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Dieses Verfahren ermöglicht neben einer Konzentrationsbestimmung der zu untersuchenden Zellsuspension auch eine Überprüfung der Zellvitalität, da sich tote Zellen aufgrund ihrer defekten Zellmembran im Unterschied zu lebenden Zellen tiefblau anfärben. Eventuell noch enthaltene Erythrozyten werden durch die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure lysiert. Darmständige Leukozyten wurden mit einer Trypanblau-Lösung angefärbt und ansonsten identisch gehandhabt. Die Auszählung erfolgte unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Die Zellkonzentration vitaler Zellen pro ml errechnet sich mithilfe folgender Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 (\text{Kammerfaktor}) = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

2.2.2.6 Immunphänotypisierung durch fluoreszente Antikörperfärbung

2.2.2.6.1 Oberflächenfärbung

Für Oberflächenfärbungen wurde ein Zelleinsatz von 1×10^6 Zellen angestrebt. Diese Zellmenge wurde mit Hilfe der zuvor ermittelten Zellzahlen in ein neues Tube mit eiskühlem FACS-Puffer pipettiert und bei 1300rpm und 4°C für 6 Minuten gewaschen. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in 50µl FACS-Puffer aufgenommen und

durchmischt. Um unspezifische Bindungen im bevorstehenden Färbeschritt zu minimieren, wurden die Fc-Bindungsstellen (*fragment cristallizable*) der zu untersuchenden Leukozyten bei 4°C für 6 Minuten mit zuvor austitrierten Konzentrationen von anti-CD16/CD32 Antikörper (1µl anti-CD16/32 pro 1×10^6 Zellen in 50µl FACS-Puffer) blockiert.

Für die Färbung wurden die Proben mit 50µl der entsprechenden Färbecocktails für 20 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Die verwendeten Färbecocktails wurden zuvor jeweils frisch zubereitet und enthielten die Fluorochrom-gekoppelten Marker in jeweils optimalen Konzentrationen. Die entsprechenden Werte waren durch Herstellerangaben und eigene Titrationsversuche vorbekannt. Nach Inkubation wurden die Proben mit FACS-Puffer bei 1200rpm und 4°C für 6 Minuten gewaschen, abgesaugt, in 200µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Analyse im Kühlschrank zwischengelagert.

2.2.2.6.2 Intrazelluläre Färbung

Für Färbungen des Transkriptionsfaktors Foxp3 sowie des Mitosemarkers Ki-67 verwendeten wir ein intrazelluläres Färbeprotokoll. Aufgrund des vergleichsweise geringen Vorkommens von Zellen, die diese beiden Zielstrukturen exprimieren, wurde auch und vor allem bei intrazellulären Färbungen ein besonderes Interesse auf eine ausreichend große Zellmenge gelegt (mindestens 1×10^6 Zellen). Zunächst durchliefen die Zellen die o.g. Oberflächenfärbung. Anschließend wurden die jeweiligen Röhrchen mit 1ml Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer versetzt und die Zellen für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln permeabilisiert. Nun wurden die Proben mit Permeabilisierungspuffer zweimal bei 1300rpm und 4°C für 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurde jede Probe mit je 100µl Färbecocktail versetzt, resuspendiert und für weitere 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Ungebundene Bestandteile des Färbecocktails wurden durch einen abschließenden Waschschritt mit 2ml Permeabilisierungspuffer (1300rpm, 4°C, 10 Minuten) beseitigt und die Zellpellets durch Resuspension in 200µl FACS-Puffer zur Analyse fertiggemacht.

2.2.2.6.3 Durchflusszytometrische Analyse am LSR II

Die Immunphänotypisierung der isolierten Zellen erfolgte durch fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie am LSR II. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich Rückschlüsse auf zellbiologische Parameter einzelner Zellen zu ziehen, wie beispielsweise ihre Größe,

Granularität und – bei entsprechender Vorbehandlung – das Expressionsmuster oberflächlicher oder intrazellulärer Antigenstrukturen.

Nach Anfärbung der Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern wurden Oberflächengefärbte Proben unmittelbar vor der Analyse zur späteren Vitalitätskontrolle mit DAPI (1ng/ml) versetzt und kurz gevortext. Über ein fest verbautes Ansaugröhrchen wurden die Zellen in das Gerät transferiert und in strenger Einzelanordnung an der Detektionseinheit über vier luftgekühlte Laser der Wellenlängen 355nm, 409nm, 488nm und 633nm angeregt (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung). Durch Absorption der so zugeführten Energie werden die verwendeten Farbstoffe auf ein höheres Energieniveau gehoben, von dem sie nach sehr kurzer Zeit unter Emittierung einer charakteristischen elektromagnetischen Strahlung wieder in ihren energetisch stabileren Grundzustand übergehen. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die physikalischen Charakteristika der verwendeten Fluorochrome.

Fluorochrom	anregende Strahlung	Absorptionsmaxima	Emissionsmaxima
DAPI	355nm	358nm	461nm
FITC	488nm	494nm	519nm
PE	488nm	496 / 546nm	578nm
PerCP	488nm	482nm	678nm
APC	633nm	650nm	660nm
PE-Cy7	488nm	496 / 546nm	785nm
PB	409nm	410nm	421nm
APC-Cy7	633nm	650nm	785nm

Tab. 2: Physikalische Kenngrößen der verwendeten Fluorochrome

Eine spezielle Elektronik detektiert das Emissionsspektrum und die Strahlungsintensität jeder vorbeigeschleusten fluorochrommarkierten Zelle und vereint die Information mit den durch Seit- und Vorwärtsstrahlung gewonnenen Daten zur Zellgröße und ihrer Granularität.

Dem Problem überlappender Emissionsspektren angeregter Fluorochrome wird durch spezielle optische Filter Rechnung getragen. So war es möglich, pro Zelle bis zu zehn unabhängige Daten zu erheben. Die in Echtzeit entstehenden Rohdaten wurden mit der Software BD FACS DIVA aufgezeichnet und anschließend mit dem Analyseprogramm FlowJo ausgewertet.

2.2.3 Molekularbiologische Verfahren

2.2.3.1 RNA-Extraktion aus Dick- und Dünndarmgewebe

Der erste Schritt zur molekularbiologischen Untersuchung des Genexpressionsmusters bestand in der Extraktion der Gewebe-RNA. Unmittelbar nach der Entnahme der zu untersuchenden Gewebe wurde mit dem Einlegen der Proben in 2% RNAlater die Voraussetzung für eine aussagekräftige Analyse geschaffen. Entfällt dieser erste Schritt, kann die instabile RNA degradiert oder manipulationsbedingt neue RNA transkribiert werden, wodurch in beiden Fällen ein fehlerhafter Nukleinsäurenpool resultieren würde. Die Gewebeproben wurden im Anschluss zunächst bei -20°C tiefgefroren und bis zum Tag der RNA-Extraktion gelagert. Alle nun folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zuerst wurden die tiefgefrorenen Gewebeproben gewogen und jeweils 30mg Gewebe mit 600µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit) in ein GentleMACS-Tube überführt. Der im RLT-Puffer enthaltene Wirkstoff GITC inaktiviert ubiquitär vorkommende und sehr robuste RNasen und schützt dadurch vor RNA-Abbau. Auf diese Weise wurden bis zu 6ml Ansatz hergestellt. Überbleibendes Gewebe wurde wieder in 2% RNAlater eingelegt und bei -20°C gelagert. Anschließend wurde der Ansatz im GentleMACS-Programmmodus „*RNA_1.1*“ zweimal hintereinander homogenisiert und der entstandene Schaum durch kurze Zentrifugation aufgelöst. Je 350µl Lysat wurden daraufhin auf eine QIAshreddersäule übertragen und mit 10000rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Eluat wurde zur Modifikation der Bindungseigenschaften mit 350µl Ethanol versetzt, anschließend auf eine RNeasy Mini-Kit-Säule übertragen und bei 3500rpm für 10 Sekunden, sowie bei 10000rpm für 15 Sekunden abzentrifugiert. Nun wurde die Säule über einem neuen Tube mit 350µl RW1-Puffer (RNeasy Mini Kit) bei 10000rpm für 15 Sekunden gewaschen. Anschließend wurde auf die Säule 80µl DNaseI-Lösung (100U/ml) pipettiert und der Ansatz für 25 Minuten inkubiert. Dieser Schritt eliminiert genomische DNA und erhöht den RNA-Ertrag. Hieran schloss sich ein weiterer Waschschriff mit 350µl RW1-Puffer und Zentrifugation bei 10000rpm für 15 Sekunden an. Es folgten 2 Waschschriffe mit je 500µl RPE-Puffer (RNeasy Mini Kit) zuerst kurz für 15 Sekunden, dann für 2 Minuten bei 10000rpm und später eine Trockenzentrifugation bei 10000rpm für 1 Minute. Zur Elution der an das Trägermaterial der Säule gebundenen RNA, wurde die Säule auf ein neues Eppendorf-Cup überführt, 40µl RNase freies Wasser auf die Mitte des Filters pipettiert, der Deckel der Säule geschlossen und

der Ansatz für 5 Minuten stehen gelassen. Durch Zentrifugation bei 10000rpm für 1 Minute wurde die gereinigte RNA aus der Säule ausgewaschen und am Grund des Gefäßes gesammelt. Der Grad der Verunreinigung durch Ethanol und Proteine, sowie die optische Dichte der isolierten RNA wurde durch spektralphotometrische Messungen mit Licht der Wellenlänge $\lambda=230, 260$ und 280nm am Analysegerät NanoDrop bestimmt und Proben nur bei zufriedenstellender Qualität für weitere Untersuchungen verwendet. Als Grenzwert für die Verunreinigung durch Ethanol und Proteine wurde ein Quotient der Absorptionen bei $\lambda=260\text{nm}$ und 230nm von 2 definiert und Proben mit kleineren Werten verworfen. Gleich verfahren wurde mit Proben, deren Absorptionsquotienten aus $\lambda=260\text{nm}$ und 280nm kleiner 2 war. Dies ist hinweisend auf eine Kontamination mit aromatischen Substanzen, DNA oder Proteinen. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Integritätsanalyse durch Gelelektrophorese

Bevor RNA-Isolate weiter verarbeitet wurden, wurde deren strukturelle Integrität durch Agarose-Gelelektrophorese unter reduzierenden Eigenschaften sichergestellt. Wie für alle Arbeiten mit Einsatz von RNA wurden auch hier allgemeingültige Sicherheitsvorschriften beherzigt. Dazu zählt eine Dekontamination des Arbeitsplatzes durch geeignete Reinigungssprays, die Verwendung von Filterspitzen, Latexhandschuhen und RNase freien oder DEPC versetzten Wassers ebenso wie eine zügige Vorgehensweise und – falls nicht anders angegeben – das Arbeiten auf Eis. Durch Vorversuche der Arbeitsgruppe legte man einen RNA-Einsatz von 500ng fest. Diese Menge wurde nach dem Auftauen und Vortexen der Proben mit einer Pipette aspiriert und in einem neuen Reaktionsgefäß mit RNase freiem Wasser auf ein Endvolumen von $2\mu\text{l}$ aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Entstandenes Kondenswasser wurde durch kurzes Zentrifugieren in der Tischzentrifuge am Boden gesammelt. Nun wurden $8\mu\text{l}$ einer Färbelösung aus Ethidiumbromid und Bromphenolblau (siehe Kapitel 2.1.6 Molekularbiologische Reagenzien und Kits) unter dem Abzug mit der Probe vermischt und später in die mit MOPS-Puffer (1x) bedeckten Geltaschen überführt. Für die Untersuchung von 8 RNA-Proben wurde ca. 50ml Gel hergestellt. Zunächst mussten hierfür $0,5\text{g}$ Agarose mit 38ml DEPC-Wasser und $2,5\text{ml}$ MOPS-Puffer (20x) unter Rühren in der Mikrowelle zum Kochen gebracht werden. Dann gab man nach einer Abkühlung unter 60°C unter dem Abzug $8,8\text{ml}$ Formaldehyd (37%) hinzu. Sobald die Temperatur des Ansatzes unter 50°C gefallen

war, wurde das Gemisch in eine abgedichtete Gelkammer mit bereits eingesetztem Kamm gegossen. Nach etwa 15 Minuten war das Gel ausgehärtet und die querseitigen Begrenzungen der Kammer konnten ebenso wie der Kamm entfernt werden. Anschließend wurde das Gel in einem Elektrophoresebecken freischwebend aufgehängt und mit MOPS-Puffer (1x) vollständig gewässert. Eventuell am Gel haftende Luftblasen wurden durch vorsichtiges Traktieren mit einer Pipettenspitze entfernt. Durch das wässrige Milieu wirkt die elektrische Spannung von 75V, welche man am Elektrophoresebecken anlegt auch auf das mit Proben beladene Gel. Die negative Ladung der RNA-Moleküle bringt es mit sich, dass sich die Proben in Richtung der positiv geladenen Anode in Bewegung setzen. Die Geschwindigkeit verhält sich dabei indirekt proportional zu Größe der Moleküle, so dass bei hinreichend langer Laufzeit – etwa 45 Minuten – eine makroskopische Trennung der in der Probe enthaltenen RNA-Moleküle möglich ist. Die Visualisierung gelang durch Anregung der in die RNA-Stränge interkalierenden Ethidiumbromid-Moleküle durch ultraviolettes Licht am „Typhoon 9200 Variable Mode Imager“ mit den Einstellungen „50microns und +3mm“. Eine stets mitgeführte Kontrolle lieferte ein physiologisches Bandenmuster mit zwei distinkten Banden im mittleren Feld, welche die 28S und 18S rRNA darstellten und den Vergleich mit den zu untersuchenden Proben erlaubte. Aus einer regelhaften Struktur der rRNA wurde auf die Integrität der ebenfalls in der Probe enthaltenen mRNA geschlossen und mit der reversen Transkription fortgefahren.

2.2.3.3 cDNA Transkription von RNA

Die Transkription der geprüften RNA-Proben in cDNA wurde mit einem M-MLV Reverse Transkriptase RNase H- Kit unter RNase freien Bedingungen auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden unter Berücksichtigung der am Gerät NanoDrop berechneten RNA-Dichte 1000ng RNA in auf ein Gesamtvolumen von 12,5µl mit RNA-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurden je 1µl *random Hexamere* und dNTPs (10µM) in jedes Reaktionsgefäß hinzugegeben und mit der Probe vermischt. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten im Heizblock bei 65°C erwärmt und die RNA dadurch linearisiert. Anschließend wurden die Proben mindestens 1 Minute auf Eis gestellt und kurz abzentrifugiert, um den teilweise am Deckel des Eppendorf-Gefäß kondensierten Inhalt wieder am Boden zu sammeln. Dem Reaktionsansatz wurde dann 4µl RNA-Puffer (5x) und 0,5µl RNasin hinzugefügt und das Gemisch für 2 Minuten bei 25°C inkubiert. Abschließend wurde jede Probe bei Raumtemperatur mit 1µl M-MLV Reverse Transkriptase versetzt. Nach 10 Minuten wurden die Reaktionsgefäße in eine entsprechende

Metallmatritze im Thermocycler überführt und die cDNA-Synthese durch Anwählen des Programms „*SUPER*“ – 50 Minuten bei 42°C – gestartet. Der Transkriptionsvorgang wurde durch eine automatisch eingeleitete Denaturierungsphase, in welcher die enzymatische Aktivität der eingesetzten reversen Transkriptase erlischt, beendet und die gewonnene cDNA bis zur Verwendung in der qRT-PCR bei -20°C gelagert.

2.2.3.4 qRT-PCR Analyse von cDNA

Die Entdeckung der Prinzipien der Polymerasen-Kettenreaktion im Jahr 1983 durch Dr. Kary Mullis *et al.* markiert einen Wendepunkt in den modernen Naturwissenschaften. Wir verwendeten eine weiterentwickelte semiquantitative Variante dieser Methode um in den zuvor extrahierten cDNA-Transkripten die relative Genexpression bestimmter GVHD-relevanter Zytokine zu bestimmen. Ein klassischer Lauf bestand aus ca. 45 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus der repetitiven Abfolge der drei Phasen Denaturierung, Annealing und Polymerisation. Das exponentielle Anwachsen der DNA-Amplifikate wird nach jedem Polymerisationsschritt semiquantitativ erfasst, in dem SYBR-Green in die kleine Furche der doppelsträngigen Nukleinsäurefragmente interkaliert und nur dort – im Gegensatz zu freiem SYBR-Green – durch kurzwellige Laserstrahlung zu einer charakteristischen elektromagnetischen Emission angeregt wird. Der Höhe des gemessenen Fotostroms ist eine Funktion der Menge an gebildeten DNA-Molekülen. Die Auswerteelektronik registriert den Zyklus, bei dem das erste mal ein zuvor definierter Schwellenwert überschritten wird. Dieser entspricht dem *Ct*-Wert (*cycle threshold*). Bei einer angenommenen Effizienz von 2 – entsprechend einer Verdopplung der DNA-Fragmente in jedem Zyklus – kann so mit großer Genauigkeit auf die Menge des ursprünglich in der Probe vorhandenen Materials zurückgerechnet werden. Die Level der untersuchten Zytokine wurden in den durchgeführten Experimenten nicht absolut angegeben, sondern immer im Bezug zu einem Genprodukt eines sogenannten *housekeeping-genes*, welches konstitutiv transkribiert wird und dessen Expression aufgrund des geringen Einflusses exogener Faktoren als weitgehend konstant angenommen wird. Dadurch kann der Fehler falsch hoher bzw. niedriger absoluter Zytokinexpressionsmengen minimiert werden. Durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden abhängig vom jeweils untersuchten Zytokin entweder die Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) als *housekeeping-genes* verwendet. Bei der Durchführung der Experimente wurden die

allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit Nukleinsäuren eingehalten (vgl. Kapitel 2.2.3.1 RNA-Isolation aus Dick- und Dünndarmgewebe) genannten. In jeweils zwei benachbarte Vertiefungen der verwendeten 96-*well*-Platte wurden 2µl einer mit RNase freiem Wasser im Verhältnis 1:6 verdünnten cDNA-Probe vorgelegt. Anschließend wurden pro Vertiefung 5µl SYBR-Green, jeweils 0,5µl Zytokin-spezifische *forward*- und *reverse-Primer* sowie 2µl RNase freies Wasser zugegeben. Zur Steigerung der Arbeitsgeschwindigkeit in der präanalytischen Phase und zur Erhöhung der Präzision der Messung wurden alle Zutaten außer der cDNA in einem sogenannten *mastermix* vorbereitet. Jeder Lauf enthielt zudem Analyseeinheiten mit reinem RNase freiem Wasser als Negativkontrolle und geeignete cDNA-Standards in logarithmischen Verdünnungen bis 1:10⁵, womit eine Standardgerade berechnet werden konnte. Der daraus abgeleitete *slope*-Wert ist ein Maß für die Effizienz der Analyse und ermöglicht zusammen mit dem *Ct*-Wert quantitative Aussagen. Die Spezifität der DNA-Vervielfältigung wurde durch Schmelzkurvenanalysen sichergestellt.

2.2.4 Histologische Analyse intestinaler Gewebe

2.2.4.1 Herstellung von Gewebeschnitten des Dick- und Dünndarms

Nach mindestens 24-stündiger Immersion in Formaldehyd (<5%) wurden die entnommenen gastrointestinalen Gewebe von den Mitarbeitern der Pathologie entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung für 24 Stunden bei 4°C wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms etwa 5µm dicke, tangentielle Schnitte angefertigt und in ein Wasserbad überführt. Von dort aus wurden die Präparate auf einen Objektträger übertragen und im Backofen von umgebendem Paraffin befreit.

2.2.4.2 HE-Färbung des Dick- und Dünndarm

Mit HE gefärbte Dick- und Dünndarmgewebeschnitte wurden für die histopathologische Beurteilung der Schwere der gastrointestinalen GVHD sowie für die Auszählung der Panethzellen herangezogen. Die entparaffinierten Präparate wurden zunächst durch eine absteigende Lösungsmittelreihe geführt. Eine Übersicht über die hierzu notwendigen Medien und die jeweiligen Inkubationszeiten gibt nachfolgende Tabelle.

Medium	Inkubationszeit
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Isopropanol (100%)	5 Minuten
Ethanol (96%)	5 Minuten
Ethanol (80%)	5 Minuten
Ethanol (70%)	5 Minuten

Tab. 3: Alkoholreihe und Inkubationszeiten konventioneller HE-Färbungen

Die HE-Färbung ist ein Beispiel für eine sogenannte Sukzedanfärbung. Das bedeutet, dass die beiden Färbemittel Hämatoxylin und Eosin nacheinander eingesetzt werden. Zunächst wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin progressiv gefärbt und der Vorgang bei der gewünschten Färbeintensität durch Spülung mit Leitungswasser abgebrochen, in der Regel nach 3 Minuten. Anschließend wurde das Zellplasma mit Eosin für etwa 10 Minuten regressiv gegengefärbt, das heißt zuerst überfärbt und dann durch Spülen mit Leitungswasser auf ein geeignetes Kontrastniveau ausdifferenziert. Dann durchliefen die Präparate die Alkoholreihe wie in obenstehender Tabelle angegeben in umgekehrter Reihenfolge und wurden anschließend mit Entellan-Schnelleindeckmittel unter Vermeidung von Lufteinschlüssen mit Deckgläschen bedeckt. Die fertigen Präparate wurden bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.4.3 Histopathologische Beurteilung von Darmpräparaten

HE-gefärbte Schnitte aus Dünn- und Dickdärmen der Versuchsgruppen wurden von Frau Dr. Elisabeth Huber aus dem Institut für Pathologie der Universität Regensburg anhand des etablierten Darm-GVHD-Score nach Kaplan *et al.* bewertet [88]. Im Rahmen dieses semiquantitativen Bewertungssystems werden für die Ausprägungen der beiden Parameter „Entzündung“ und „Apoptose“ aufsteigend Werte von 0-4 vergeben. Die Summe der beiden vergebenen Werte gibt Aufschluss über die Schwere der Darmaffektion.

2.2.4.4 Foxp3-Intrazellulärfärbung

Die histologische Untersuchung des Treg-Kompartiments im Dick- und Dünndarm machte mangels fehlender Charakteristika in der Routinefärbung eine immunhistochemische Färbung des spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 notwendig. Hierzu wurden die Objektträger mit

den Gewebeschnitten für 30 Minuten im Backofen bei 80°C inkubiert. Anschließend durchliefen die Präparate eine Alkoholreihe abnehmender Konzentration und wurden daraufhin mit VE-Wasser neutralisiert. Einen Überblick über die verwendeten Lösungsmittel und die zugehörigen Inkubationszeiten gibt die nachfolgende Tabelle.

Medium	Inkubationszeit
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Ethanol (100%)	3 Minuten
Ethanol (100%)	3 Minuten
Ethanol (96%)	3 Minuten
Ethanol (96%)	3 Minuten
Ethanol (70%)	3 Minuten

Tab. 4: Alkoholreihe und Inkubationszeiten Intrazellulärfärbung

Die Schnitte wurden daraufhin in eine mit Citratpuffer gefüllte Färbeküvette eingelegt und für 32 Minuten bei 300 Watt in der Mikrowelle ausgekocht. Nach Abkühlung wurden die Schnitte dreimal mit VE-Wasser gewaschen und einzeln in Coverplates eingespannt. Nach doppelter Behandlung mit Waschpuffer (1x) wurden die Präparate mit 100µl Peroxidase-Block für 5 Minuten inkubiert und anschließend weitere zweimal mit Waschpuffer (1x) gewaschen. Dann wurde die Schnitte mit 100µl verdünntem Primärantikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zwei weitere Waschschrte vom Präparat entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 3 Tropfen Sekundär-Antikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Auch hieran schloss sich ein doppelt ausgeführter Waschschrte an, um unspezifische Signalbildung zu verhindern. Nun wurden die Präparate mit 100µl DAB benetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Reaktion wurde durch Spülen mit VE-Wasser abgebrochen. Anschließend ordnete man die Schnitte in einem Metallträgersystem ein und färbte die Präparate für wenige Sekunden in Hämatoxylin. Es folgte eine Färbedifferenzierung mit HCL-Ethanol. Dann wurden die Präparate 1 Minute lang im warmen Leitungswasser gewaschen. Hierauf durchliefen die Präparate das in obenstehender Tabelle dargestellte Lösungsmittelprotokoll in umgekehrter Reihenfolge und wurden mit Eukitt eingedeckelt. An jedem Färbetag wurde zur Qualitätskontrolle jeweils ein maximal zwei Wochen altes natives Thymuspräparat über das identische Färbeprotokoll angefertigt (Positivkontrolle). Ein weiteres Präparat, das keinen

Foxp3-Primär-AK enthielt, diente als Negativkontrolle. Einen repräsentativ gefärbten Schnitt zeigt untenstehende Abbildung.

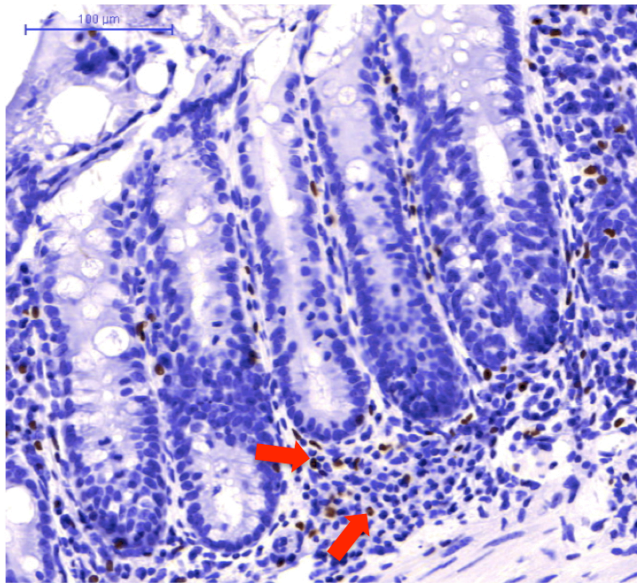


Abb. 6: Immunhistochemische Färbung auf Foxp3

Rote Pfeile markieren kryptennah gelegene Treg (braun) im Dickdarminterstitium.

2.2.4.5 Automatisierte Zellauszählung mit TissueFAXS

Zur näheren Beschreibung des Treg-Kompartiments im Dick- und Dünndarm wurde mit TissueFAXS der Firma TissueGnostics ein neues Verfahren etabliert, das die automatisierte Auszählung großer Schnittflächen erlaubte.

In immunhistochemisch gefärbten Präparaten wurden bei mittlerer Vergrößerung (100x) fünf unzusammenhängende Bereiche definiert und mit Hilfe einer hochauflösenden Optik (400x) digitalisiert. In den eingelesenen Arealen wurden im Anschluss zehn standardisierte *regions of interest* (ROIs, jeweils 2mm^2) bei geringer Vergrößerung des digitalisierten Schnitts angelegt.

Durch eine in Vorversuchen optimierte Konfiguration von optischen Parametern wurde in den angelegten ROIs der absolute Zellgehalt und die Anzahl immunhistochemisch angefärbter Treg bestimmt. Die Ausgabe der Daten erfolgte in Form eines aus FACS-Anwendungen bekannten *Scattergramms*, in welchem Treg als Zielpopulation dargestellt werden konnten. Die Korrektheit der automatisierten Zellerkennung wurde durch konsequentes *backgating* überprüft. Mit dieser Funktion werden im eingescannten Schnitt Zielzellen durch eine rote Umzeichnung von den übrigen Zellen abgehoben. Die Konfiguration der Zellerkennungsmasken können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Konfiguration der generellen Zellerkennung „Hemalaun“	
Parameter	Wert
Nuclei size	5
Discrimination area	3
Discrimination gray	1
Automatic background threshold	Yes
Threshold range	[5,255]
Virtual channel	Nuclear
Post processing order	Remove, merge
Remove labels	No
Use merging rules	yes
Max combined area	59,73µm ²
Max involved compactness	0,9
Group max	4
Min resulted compactness	0,5
Konfiguration Zielzellerkennung „Foxp3“	
Parameter	Wert
Use ring mask	Yes
Interior radius	-0,35µm
Exterior radius	0,38µm
Use identified cell mask	No
Use nuclei mask	Yes
Automatic background threshold	Yes
Threshold range	[5,255]

Tab. 5: Konfiguration der Zellerkennungsmasken

Dargestellt ist die Konfiguration der allgemeinen Zellerkennungsparameter („Hemalaun“) zur automatisierten Erfassung aller kernhaltiger Strukturen in definierten ROIs. Durch eine Zielerkennungsmaske werden zudem mit DAB immunhistochemisch angefärbte Treg erfasst und in einem Scattergramm als Foxp3⁺ Population ausgegeben.

Den Arbeitsfluss mit TissueFAXS und der anschließenden Auswertung mit HistoQuest illustriert folgendes Schema.

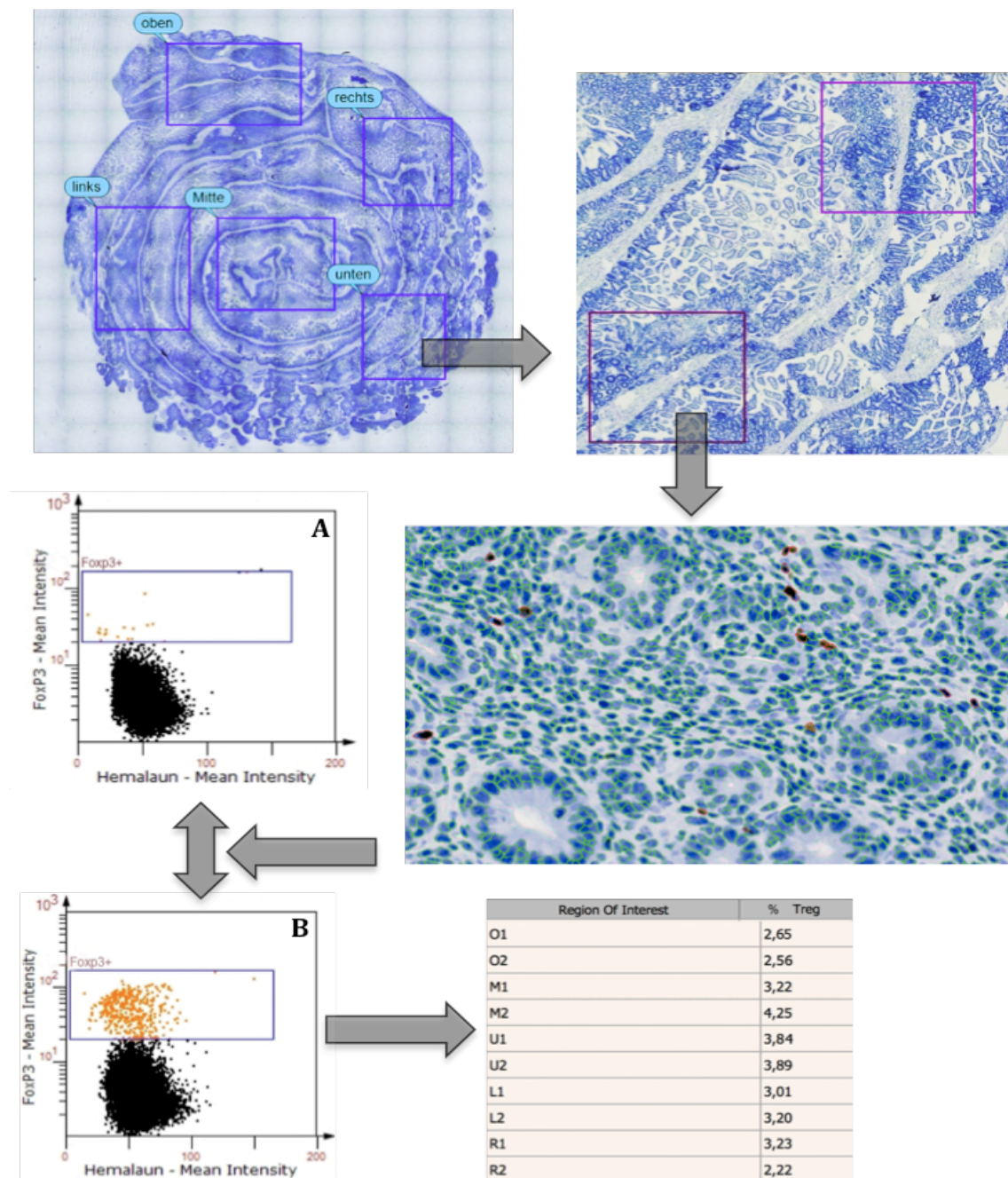


Abb. 7: Arbeitsfluss der automatisierten Zellerkennung mit TissueFAXS

Dick- und Dünndarmpräparate von Versuchstieren und unbehandelten Spendern (Foxp3DTRgfp) und Empfängern (BALB/c), in denen Foxp3 immunhistochemisch angefärbt wurde, wurden bei mittlerer Vergrößerung digitalisiert. Anschließend wurden 5 Areale über die gesamte Ausdehnung des Präparats definiert und hochauflösend (400x) aufgenommen. In jedem Areal wurden willkürlich 2 regions of interest (ROIs, jeweils 2mm^2) im Interstitium angelegt, in denen in der Folge über etablierte Zellerkennungsmasken Foxp3⁺ Zielzellen (braun, rot umrandet) von anderen kernhaltigen Zellen (blau, grün umrandet) diskriminiert wurden. Die Auszählung einer jeden ROI wurde in Form eines

Scattergramms ausgegeben und die Foxp3^+ Population bestimmt. Über systematisches backgating wurde die Korrektheit der Zellerkennung fortlaufend überprüft. Schaubild A zeigt ein repräsentatives Scattergramm einer Foxp3 -depletierten Maus, Schaubild B eine Maus aus der PBS-Gruppe. Die Daten aller 10 ROIs aus 5 Arealen wurden für jedes Präparat als Prozentwerte von Foxp3^+ Zellen (Treg) unter allen kernhaltigen Zellen kombiniert und die gemittelten Einzelwerte für die statistische Auswertung herangezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche – Überleben nach alloKMT

In einem ersten Ansatz wurden die Versuchstiere, wie in Kapitel 2.2.1.1 schematisiert, nach letaler Bestrahlung über komplette MHC-Grenzen mit KMges (Gesamt-Knochenmark) transplantiert und ihr Überleben über einen Zeitraum von insgesamt 63 Tagen beobachtet.

Wie aus Abb. 8 ersichtlich, zeigten sich abhängig vom Zeitpunkt der (Spender-)Treg-Depletion durch intraperitoneale Applikation von DT keine Unterschiede im Überleben von transplantierten Tieren, wenn die Manipulation bereits im unbehandelten Spender an den beiden Tagen vor alloKMT stattgefunden hat. Die Unterschiede hinsichtlich des Überlebens im Szenario der Treg-Depletion an d5, 7 und 9 erreichten aufgrund der geringen Gruppengröße von jeweils 5 Tieren keine statistische Signifikanz, deuten aber auf einen Überlebensvorteil von Tieren der PBS-behandelten Gruppe hin. Deutliche Effekte traten hingegen bei DT-Gabe an d26, 28 und 30 nach alloKMT auf. Hier zeigte sich das Bild einer akut um d40 nach alloKMT einsetzenden letalen Erkrankung. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erreichten hier das höchste Signifikanzniveau.

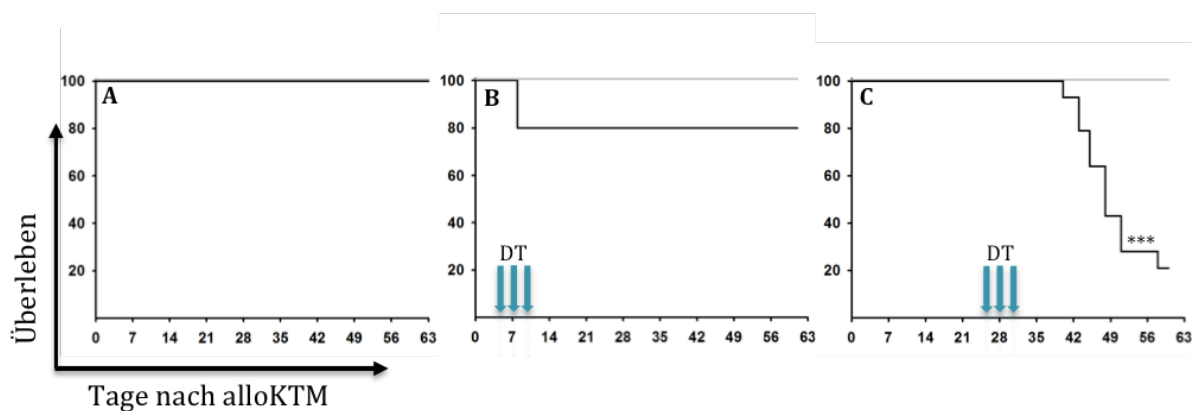


Abb. 8: Überleben in Abhängigkeit zeitlich veränderter DT-Gabe

Dargestellt sind Überlebenskurven von Transplantatempfängern mit jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten der DT-Gabe bei ansonsten identischem Versuchsaufbau. In jedem Experiment wurden letal bestrahlte BALB/c-Mäuse (9Gy) mit $2,5 \times 10^6$ KMges aus *Foxp3DTRgfp*-Tieren transplantiert und das Überleben im Zeitraum von 63d nach alloKMT beobachtet. Treg wurden durch intraperitoneale Verabreichung von DT (0,5µg) an d-2 und d-1 in Spendern (A, nicht dargestellt) und an d5, 7 und 9 (B) bzw. d26, 28 und 30 (C) in Empfängern eradiziert. Kontrollen erhielten jeweils zeitgleich PBS-Injektionen. Die statistischen Auswertung mit dem Log-Rank-Test zeigt für A und B keine Signifikanz und für C die höchste Signifikanzstufe (***)

Eingesetzte Tiere in A und B jeweils n=5, in C: DT-Gruppe n=14, Kontrolle n=9.

3.2 Klinische Symptomatik nach Spender-Treg-Depletion

Um die zugrundeliegenden Vorgänge besser charakterisieren zu können, wurden analog zu den Überlebensversuchen neue Experimente initiiert, wobei Spender-Treg an d26, 28 und 30 bzw. d5, 7 und 9 nach alloKMT eliminiert wurden. Der Zeitpunkt detaillierter Analysen wurde vor dem Hintergrund des fulminanten Verlaufs eines Teils der Versuchstiere in beiden Ansätzen auf den 10. bzw. 11. Tag nach der letztmaligen DT-Injektion gelegt. Damit liefen die Experimente im ersten Szenario über einen Zeitraum von 39 bzw. 40 Tagen („Langzeit“), im zweiten Szenario über 19 bzw. 20 Tage („Kurzzeit“). Während des gesamten Zeitraums wurden die Versuchstiere regelmäßig gewogen und ihr Zustand anhand des etablierten GVHD-Scores nach Cooke *et al.* [87] beurteilt.

3.2.1 Ausschaltung von Spender-Treg an d26, 28 und 30 nach alloKMT („Langzeit“)

Die folgenden Graphen zeigten zunächst ein typisches Muster für Versuchstiere beider Gruppen: Im Rahmen der Konditionierung durch letale Bestrahlung wurde die Empfängerhämatopoese weitestgehend eliminiert und die Versuchstiere traten in die sogenannte Aplasiephase ein. Als Korrelat des erlittenen Strahlungsschadens verloren beide Versuchsgruppen in etwa 4g Körpergewicht und entwickelten einen leichten Score auf der GVHD-Skala nach Cooke *et al.*, bedingt durch ein struppiges Fell auf der ventralen Rumpfseite und eine dezente kyphotische Haltung in Ruhe. Bis zum Tag der ersten DT-Gabe erholten sich die Tiere im Zuge des *engraftments* der Spenderhämatopoese: die Mäuse legten wieder an Gewicht zu und äußerlich sichtbare Veränderungen verschwanden fast vollständig. Während Tiere der PBS-Gruppe über den gesamten weiteren Versuchszeitraum ein nur diskret von physiologischen Verhältnissen abweichendes Gewicht halten konnten, verloren DT-behandelte Tiere kurz nach der ersten Injektion rapide an Gewicht und zeigten durch eine akute Verschlechterung ihrer Symptomatik den Beginn der aus Überlebensversuchen erwarteten letalen Erkrankung an.

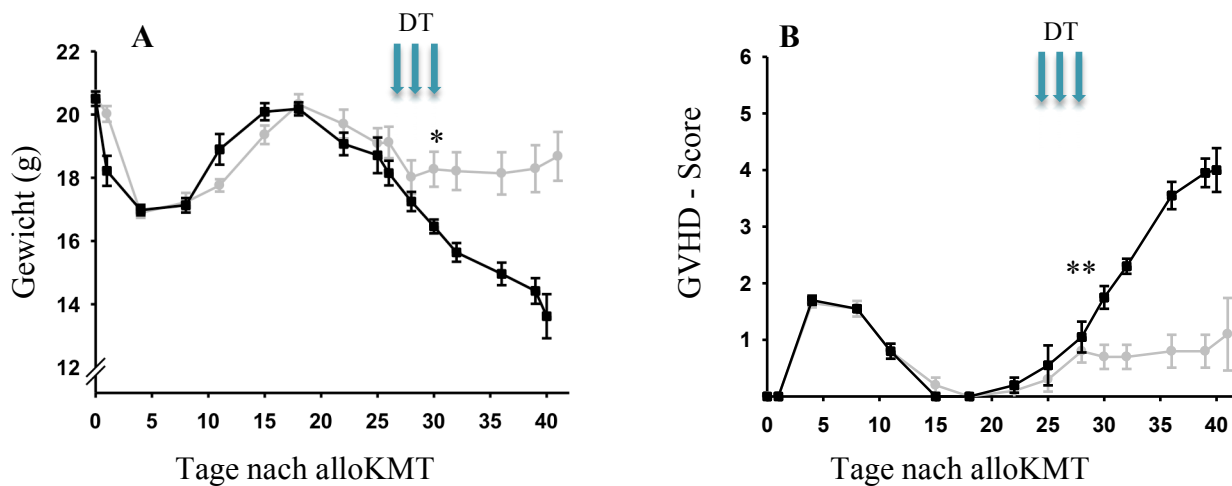


Abb. 9: Gewichtsverlauf und GVHD-Score nach alloKMT

Dargestellt ist der Gewichtsverlauf (A) und der semiquantitative GVHD-Score nach Cooke *et al.* (B) der beiden Versuchsgruppen (graue Kreise = PBS-Gruppe, schwarze Quadrate = DT-Gruppe). Treg-depletierte Tiere zeigen ab der Intervention deutliche Krankheitszeichen mit signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe ab d30. Kombinierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (jeweils $n=10$). Fehlerbalken repräsentieren SEMs. Statistische Auswertung mit dem two-tailed-student's-t-test, Signifikanzen $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**).

3.2.2 Ausschaltung von Spender-Treg an d5, 7 und 9 nach alloKMT („Kurzzeit“)

Beide Gruppen zeigten früh nach der myeloablativen Konditionierung den für die Aplasiephase typischen Gewichtsverlust. Parallel dazu stellten sich milde Fellveränderungen ein. Während sich der Zustand der PBS-Tiere fortlaufend verbesserte und bis zum Ende des Versuchszeitraums wieder vollständig normalisierte, persistierte die Symptomatik von Mäusen nach DT-Injektion bis d12. Im weiteren Verlauf zeichnete sich auch in der DT-Gruppe eine beginnende Erholung ab, die sich in langsam steigenden Körpergewichten und Rückbildung des GVHD-Scores nach Cooke *et al.* manifestierte.

Nichts desto trotz blieben bis zur Analyse der Versuchstiere an d19 und 20 hochsignifikante Unterschiede des Körpergewichts und der äußeren Erscheinung bestehen.

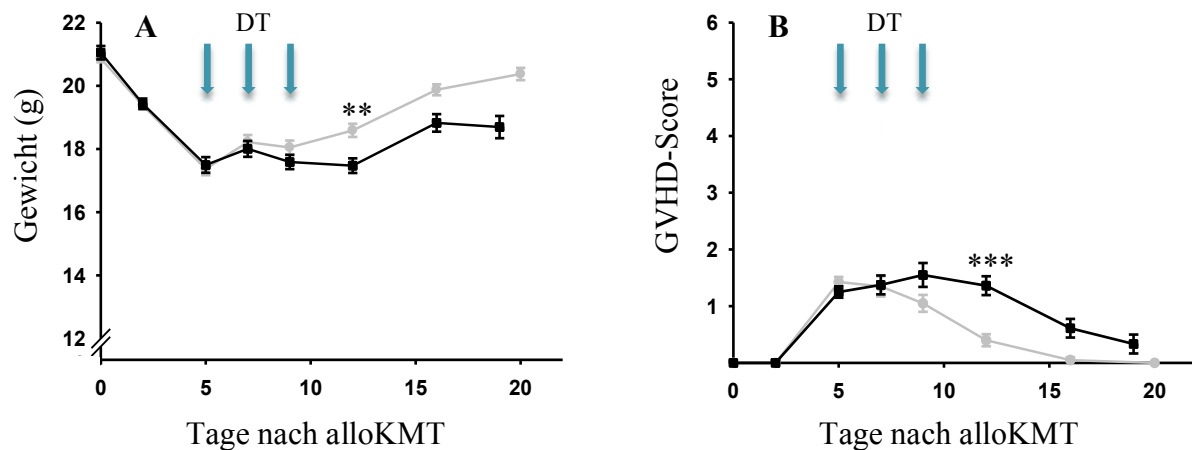


Abb. 10: Gewichtsverlauf und GVHD-Score nach alloKMT

Dargestellt ist der Gewichtsverlauf (A) und der semiquantitative GVHD-Score nach Cooke et al (B) der beiden Versuchsgruppen (graue Kreise = PBS-Gruppe, schwarze Quadrate = DT-Gruppe). Treg-depletierte Tiere zeigen einen reduzierten Allgemeinzustand und (trotz Anzeichen der Erholung ab d12) bis zum Versuchsende hochsignifikante Unterschiede in Gewicht und Score im Vgl. zu PBS-Tieren. Kombinierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (jeweils $n=20$). Fehlerbalken repräsentieren SEMs.

Statistische Auswertung mit dem two-tailed-student's-t-test, Signifikanzen $p<0,01$ (**), $p<0,001$ (***).

3.3 Histologische Veränderungen im GI-Trakt nach Treg-Depletion

3.3.1 Langzeit

Die auffälligen Parallelen im Hinblick auf Überleben und Symptomatik zwischen Treg-depletierten Empfängern und Versuchstieren, bei denen durch adoptiven Transfer von alloreaktiven reifen Spender-T-Zellen GVHD induziert wurde, veranlasste uns zu feingeweblichen Untersuchungen von Dick- und Dünndärmen der beiden experimentellen Gruppen. Dabei legte bereits der makroskopische Aspekt der frisch entnommenen Gewebe eine Darmaffektion von Spender-Treg-depletierten Tieren nahe. Die intestinalen Proben erschienen ödematös verändert und verkürzt im Vergleich zu Präparaten aus PBS-behandelten Kontrollen. Die weitergehende Analyse der HE-gefärbten Schnitte zeigte auffällige Abweichungen von der physiologischen Schleimhautarchitektur, wobei die histologischen Befunde im Dickdarm am ausgeprägtesten waren. In Dick- und Dünndärmen der DT-Gruppe imponierte das Vollbild einer floriden Entzündungsreaktion mit Infiltration von lymphozytären und mononukleären Immunzellen und zum Teil ulzerierenden Veränderungen der Mukosa. Weiterhin fielen partielle Kryptenverluste mit epithelial regenerativen Arealen auf. Die Apoptoserate war in Organen der DT-Gruppe ebenfalls

pathologisch erhöht. Die geschilderten Alterationen schlugen sich in einem gegenüber der PBS-Gruppe hochsignifikant erhöhten Kaplan-Score [88] sowohl des Dick- als auch des Dünndarms nieder (Dickdarm DT: $6,1 \pm 0,5$, PBS: $2,90 \pm 1,7$; Dünndarm DT: $4,7 \pm 1,03$, PBS: $2,1 \pm 1,02$).

Neben dieser globalen Beurteilung des histologischen Status wurden Dünndarm-stämmige Panethzellen in Proben der beiden Versuchsgruppen quantifiziert und in Relation zu unbehandelten Empfängern gesetzt. Aufgrund ihres markanten Aussehens und ihrer charakteristischen Lokalisation am Grund der Dünndarm-Krypten können diese Zellen in konventionellen HE-Schnitten leicht identifiziert werden. Bei der vergleichenden Auszählung von mindestens 6 HPFs (400x) zeigten sich in beiden experimentellen Gruppen statistisch hochsignifikant verringerte Mengen an Panethzellen, wobei das vollständige Verschwinden dieser Zellart für die DT-Gruppe spezifisch war (DT: 0 Zellen, PBS: 11 ± 4 Zellen, Empfänger: $36,7 \pm 2,3$).

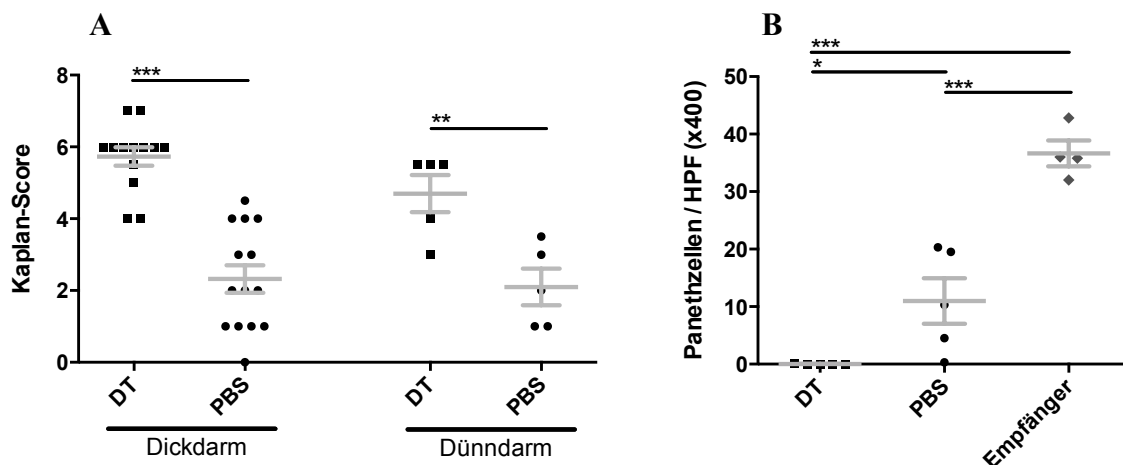


Abb. 11: Histopathologische Begutachtung und Panethzellquantifizierung nach alloKMT

Dargestellt sind der histopathologische Score nach Kaplan et al. in Dick- und Dünndärmen (A) und die Quantifizierung von Panethzellen in mindestens 6 HPFs (x400) in Dünndärmen (B) von allogenen transplantierten BALB/c-Empfängern (Bestrahlung mit 9Gy, Transplantat: $2,5 \times 10^6$ KMges aus Foxp3DTRgfp-Spendern). In B dienen unbehandelte Empfänger (n=4) als Kontrolle. Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT entweder DT-Injektionen (schwarze Quadrate, n=5-13) oder PBS verabreicht (schwarze Kreise, n=5-14). Die Präparate wurden nach Organentnahme um d40 nach alloKMT mit HE gefärbt und bewertet. Die Fehlerbalken repräsentieren SEMs. Die statistische Analyse wurde entweder mit dem two-tailed-student's-t-test (A) oder mittels Anova-One-Way Varianzanalyse und anschließendem Bonferroni-backtest (B) durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Kombinierte Daten aus drei unabhängigen (A), bzw. einem repräsentativen (B) Experiment.

3.3.2 Kurzzeit

Trotz des insgesamt blanderen Verlaufs bei Treg-Depletion innerhalb der Rekonstitutionsphase an d5, 7 und 9 traten in der histologischen Untersuchung von Dick- und Dünndarmpräparaten ähnliche Schädigungsmuster wie bei der oben beschriebenen späten Manipulation ab d26 nach alloKMT zu Tage. Im Dickdarm führte der histologische Nachweis von infiltrierenden Entzündungszellen, der partielle Verlust von Krypten und eine erhöhte Apoptoserate in DT-behandelten Tieren zu einem gegenüber der PBS-Gruppe stark erhöhten Score auf der Kaplan-Skala (DT: $5,8 \pm 0,4$, PBS: $1,7 \pm 0,5$), der in entsprechenden Dünndarmabschnitten bei analogen pathologischen Auffälligkeiten reproduzierbar war (DT: $5,6 \pm 0,3$, PBS: $3,7 \pm 0,2$).

In der lichtmikroskopischen Auszählung des Panethzellkompartiments erreichten die gefundenen Unterschiede zwischen DT-behandelten Tieren und der PBS-Gruppe keine Signifikanz (DT: $19 \pm 3,5$ Zellen PBS: $28,4 \pm 3,6$ Zellen). Tiere der DT-Gruppe zeichneten sich gegenüber unbehandelten Empfängern ($36,7 \pm 2,3$ Zellen) jedoch durch signifikant spärlichere Panethzellpopulationen aus. PBS-Tiere zeigten fast physiologische Mengen dieser kryptenständigen Zelllinie.

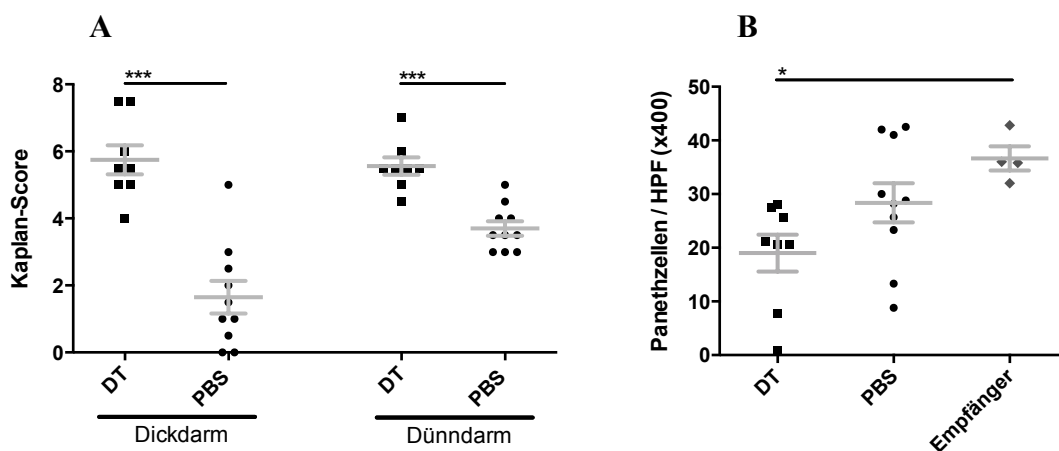


Abb. 12: Histopathologische Begutachtung und Panethzellquantifizierung nach alloKMT

Dargestellt sind der histopathologische Score nach Kaplan et al. in Dick- und Dünndärmen (A) und die Quantifizierung von Panethzellen in jeweils 6 HPFs (x400) in Dünndärmen (B) von allogenen transplantierten BALB/c-Empfängern (Bestrahlung mit 9Gy, Transplantat: $2,5 \times 10^6$ KMges aus Foxp3DTRgfp-Spendern). In B dienen unbehandelte Empfänger (n=4) als Kontrolle. Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT entweder DT-Injektionen (schwarze Quadrate, n=8) oder PBS verabreicht (schwarze Kreise, n=10). Die Präparate wurden nach Organentnahme um d20 nach alloKMT mit HE gefärbt und bewertet. Die Fehlerbalken repräsentieren SEMs. Die statistische Analyse wurde entweder mit dem two-tailed-student's-t-test (A) oder mittels Anova-One-Way

Varianzanalyse und anschließend Bonferroni-backtest (B) durchgeführt ($p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Kombinierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.*

3.4 Quantifizierung von mukosaständigen Treg

3.4.1 Langzeit

Die histologischen Auffälligkeiten veranlassten uns im Folgenden, das Kompartiment der mukosaständigen Treg weiter zu untersuchen. Dabei wurden Treg durch die immunhistochemische Färbung des zellspezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 markiert und ihr Vorkommen sowie ihr Verteilungsmuster im Darmparenchym evaluiert.

Nach der Digitalisierung entsprechend gefärbter Schnitte konnte sowohl für den Dickdarm, als auch für den Dünndarm gezeigt werden, dass die Gabe von DT an den d26, 28 und 30 nach alloKMT zu einer profunden Depletion von Treg führt. In der DT-Gruppe zeigte sich im Dickdarm im Vergleich zu den PBS-Tieren ein hochsignifikant verringerter Anteil von mukosalen Treg unter allen angeschnittenen Zellen (DT: $0,28 \pm 0,04\%$, PBS: $3,03 \pm 0,2\%$).

Auch im Dünndarm überstieg die Frequenz gewebeinfiltrierender Treg in der PBS-Gruppe die der DT-Gruppe um ein Vielfaches (DT: $0,13 \pm 0,03\%$, PBS: $2,98 \pm 0,37\%$). Unbehandelte Spender und Empfänger wiesen in immunhistochemisch gefärbten Sektionen der Dick- und Dünndarmschleimhaut ebenfalls sehr geringe Treg-Frequenzen auf (Dickdarm Spender: $0,19 \pm 0,05\%$, Dickdarm Empfänger: $0,74 \pm 0,07\%$, Dünndarm Spender: $0,25 \pm 0,01\%$, Dünndarm Empfänger: $0,32 \pm 0,05\%$). Jedoch muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass unbehandelte Tiere über histologisch klar abgrenzbare, spezielle immunologische Nischen des *gut-associated-lymphoid-tissue* (GALT) verfügen, in denen zum teil massenhaft Treg angetroffen werden können (siehe Abb.13). Da bei transplantierten Tieren diese Strukturen nicht mehr identifizierbar sind, beschränkten wir uns bei der Quantifizierung des Treg-Kompartments auf das Interstitium. Folglich müssen die geringen Treg-Frequenzen im Interstitium unbehandelter Tiere anders bewertet werden als die absolute Armut dieser Zelllinie in der DT-Gruppe.

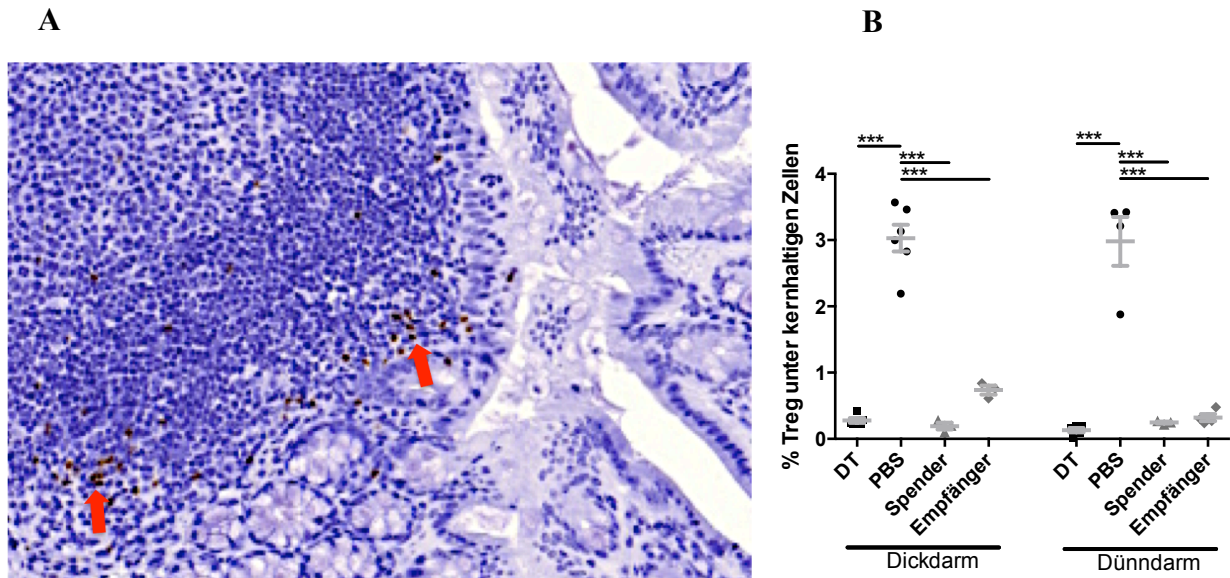


Abb. 13: Treg-Quantifizierung in immunhistochemisch gefärbten Dick- und Dünndarmschnitten

In der immunhistochemischen Färbung von Foxp3 kommen Treg des Dick- und Dünndarms braun zur Darstellung (A, rote Pfeile). In unbehandelten Tieren (A, Dünndarm einer unbehandelten BALB/c-Maus) zeigt sich ein auffälliges Verteilungsmuster mit robusten, in Lymphfollikeln organisierten Treg-Populationen und nur wenig diffus im Interstitium verteilten Vertretern dieser Zelllinie. Die automatisierte Auszählung mit TissueFAXS zeigt in Dick- und Dünndärmen der PBS-Gruppe hohe Treg-Frequenzen im Vergleich zu DT-behandelten Versuchstieren (DT-Gabe an d26, 28 und 30 nach alloKMT) und unbehandelten Mäusen (B). Die Fehlerbalken repräsentieren SEMs. Die statistische Analyse wurde in Form einer Anova-One-Way Varianzanalyse und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Kombinierte Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

3.4.2 Kurzzeit

Für die Auszählung der Dickdärme konnte aufgrund von technischen Limitationen nicht auf die automatisierte Analyse mit TissueFAXS zurückgegriffen werden. Stattdessen wurden Treg in zehn repräsentativen HPFs (400x) des Dickdarmparenchyms ausgezählt und die gemittelten Werte mit denen der PBS-Gruppe und unbehandelter Spender und Empfänger verglichen. In der PBS-Gruppe wurden in etwa fünfmal so viele Treg detektiert wie in der DT-Gruppe. Jedoch waren die Unterschiede aufgrund der großen Streuung der Einzelwerte statistisch nicht signifikant (DT: $0,5 \pm 0,2$ Treg/HPF, PBS: $2,5 \pm 0,7$ Treg/HPF).

Die Werte lagen für unbehandelte Spender mit $0,2 \pm 0,1$ Treg/HPF und mit $0,7 \pm 0,1$ Treg/HPF bei unbehandelten Empfängern in etwa in der Größenordnung der DT-Gruppe.

Im Dünndarm führte die Behandlung mit DT zu eindrucklicheren Effekten. Die computergestützte Auszählung mit TissueFAXS ergab für Tiere der DT-Gruppe hochsignifikant niedrigere Treg-Frequenzen im Interstitium als für Tiere der PBS-Gruppe.

Unbehandelte Tiere wiesen gegenüber der PBS-Gruppe ebenfalls erniedrigte prozentuale Anteile von Treg auf und der Unterschied zwischen der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern erreichte Signifikanz (DT: $0,1 \pm 0,01\%$, PBS: $0,56 \pm 0,07\%$, Spender: $0,25 \pm 0,01\%$, Empfänger: $0,32 \pm 0,05\%$).

Wie bei den Experimenten der späten Ausschaltung von Spender-Treg ausgeführt, spiegeln die detektierten Werte nur die Treg-Verteilung im Interstitium wider. In unbehandelten Tieren finden sich jedoch sowohl im Dick- als auch im Dünndarm große Treg-Populationen in Follikeln organisiert, welche bei der Auszählung der Schnitte keine Berücksichtigung fanden. Somit reflektieren die geringen Treg-Frequenzen lediglich ein anderes Verteilungsmuster und die Treg-Armut in Spendern und Empfängern ist nur scheinbar.

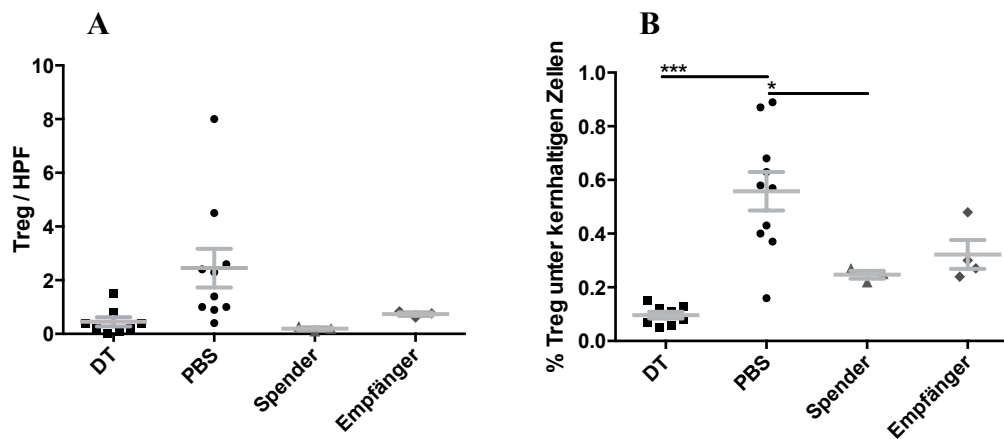


Abb. 14: Treg-Quantifizierung in immunhistochemisch gefärbten Dick- und Dünndarmschnitten

Aufgrund technischer Limitationen erfolgte die Quantifizierung parenchym-infiltrierender Treg in den Dickdarm-Präparaten manuell durch Auszählung von zehn repräsentativen HPFs (400x, A).

Die automatisierte Auszählung mit TissueFAXS zeigte stark erhöhte Treg-Frequenzen in den untersuchten Dünndarm-Präparaten der PBS-Gruppe gegenüber den anderen Gruppen an (B). Unterschiede gegenüber der DT-Gruppe (DT-Gabe an d5,7 und 9 nach alloKMT) und unbehandelten Spendern erreichten Signifikanz. Die Fehlerbalken repräsentieren SEMs. Die statistische Analyse wurde in Form einer Anova-One-Way Varianzanalyse und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Kombinierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.5 qRT-PCR Transkriptom-Analyse GVHD relevanter Gene in Dick- und Dünndarm

3.5.1 Langzeit

Zur Ergänzung bereits erhobener Befunde wurde aus Dick- und Dünndärmen der beiden Versuchsgruppen und unbehandelten Spendern und Empfängern RNA extrahiert. Diese wurde im Anschluss in cDNA transkribiert und zur Charakterisierung des vorherrschenden Zytokinmilieus mittels *quantitativer real time-PCR* (qRT-PCR) untersucht. Bei der späten DT-Gabe an d26, 28 und 30 nach alloKMT zeigte sich bei Entnahme der Organe um d40 im Dickdarm folgendes Bild:

Die normierte Konzentration des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 war in DT-Tieren um den Faktor 67 gegenüber der PBS-Gruppe erniedrigt. Gleichzeitig überstiegen die gefundenen Werte in der PBS-Gruppe die physiologischen Werte unbehandelter Spender und Empfänger im Schnitt um das 6 bis 15-fache. Die Veränderungen in der PBS-Gruppe waren gegenüber allen anderen Gruppen hochsignifikant. Die Expressionsraten von IL-22 übertrafen in der PBS-Gruppe alle anderen Gruppen, waren jedoch nur gegenüber unbehandelten Spendern signifikant unterschiedlich. Im Hinblick auf IL-10 unterschieden sich die experimentellen Gruppen nicht signifikant, wohl aber im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

Gleichzeitig imponierten in der DT-Gruppe erhöhte Expressionslevel proinflammatorischer Zytokine. In beiden experimentellen Gruppen wurden signifikant erhöhte Konzentrationen von TNF im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen detektiert, wobei die Unterschiede zwischen der DT-Gruppe und unbehandelten Spendern und Empfängern ausgeprägter ausfielen als zwischen unbehandelten Tieren und Mäusen der PBS-Gruppe. Tiere der DT-Gruppe zeigten gegenüber der PBS-Gruppe um den Faktor 1,7 signifikant erhöhte relative Expressionslevels von TNF. Ähnlich verhält es sich für INF- γ . Wir bestimmten hochsignifikant erhöhte normierte Konzentrationen in der DT-Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen, wobei auch in Tieren der PBS-Gruppe erhöhte Expressionsraten auffielen. Bei von Analyse auf MIP-2 und CCL-2 fanden wir in der DT-Gruppe ca. 3-fach erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu PBS-Tieren. In unbehandelten Tieren waren diese beiden chemotaktisch aktiven Stoffe nur in geringer Konzentration nachweisbar. Für die Unterschiede zwischen der PBS-Gruppe und unbehandelten Tieren wurde keine Signifikanz errechnet.

Gegenüber unbehandelten Spendern fiel bei Betrachtung der Expressionsniveaus von IL-6 in den Versuchsgruppen eine durchschnittlich 7 bis 8-fache Erhöhung auf, jedoch wurde aufgrund großer Streuung der Einzelwerte keine Signifikanz gefunden. Die normierte Konzentration von IL-17 überstieg in der PBS-Gruppe die aller anderen Gruppen um mindestens das 7-fache.

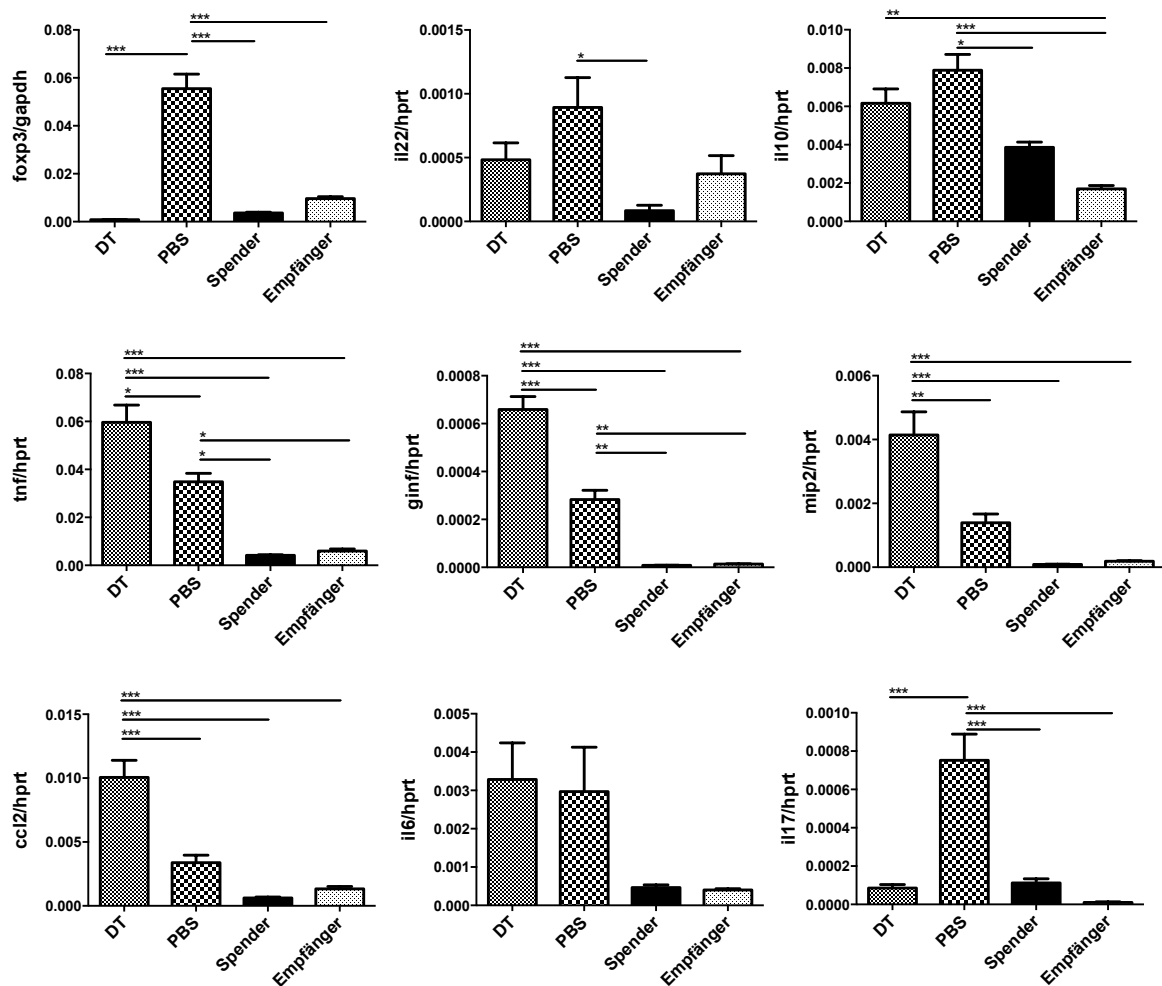


Abb. 15: Zytokinexpressionsprofil auf Transkriptionsebene im Dickdarm

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (feine Karos, $n=10-12$) oder PBS (Schachbrett, $n=9$). Dargestellt sind mittels qRT-PCR gemessene, normierte Expressionen einer Reihe GVHD-relevanter Zytokine im Dickdarm nach Organentnahme um d40 nach alloKMT. Als Referenz wurden entsprechende Konzentrationen auch in unbehandelten Spender (Foxp3DTRgfp, schwarz, $n=5$) und unbehandelten Empfängern (BALB/c, feine Punkte, $n=5$) untersucht. Für die PCR-Analysen wurden cDNA-Transkripte isolierter Gesamt-RNA jeweils doppelt eingesetzt und die Ergebnisse gemittelt. Als housekeeping-genes wurden je nach Angabe gapdh oder hprt verwendet. Die Fehlerbalken repräsentieren jeweils SEMs. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Die Daten stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Ein ähnliches Bild ergab sich für das Expressionsprofil derselben Zytokine im Dünndarm. Während die Expression von Foxp3 in der PBS-Gruppe gegenüber unbehandelten Spendern und Empfängern bis zu 5-fach erhöht war, führte die Depletion von Treg in der DT-Gruppe zu einer eindrucklichen Verringerung der Foxp3-Konzentration. Daneben zeigte sich in der DT-Gruppe ein Einbruch der Transkription des Panethzell-Defensins Reg3- γ gegenüber allen anderen Gruppen, der im Vergleich zu der PBS-Gruppe höchste Signifikanz erreichte. Die gemessenen Expressionsraten unterschieden sich zwischen den experimentellen Gruppen um den Faktor 10. Für IL-22 fanden wir erniedrigte Werte in der DT-Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen, wobei nur der Unterschied zur PBS-Gruppe signifikant war. Interessanterweise konnten in der DT-Gruppe stark erhöhte Expressionsraten für IL-10 detektiert werden, die entsprechende Werte in allen anderen Gruppen um das 4 bis 6-fache überstiegen.

Als Korrelat der entzündlichen Prozesse, welche durch die Verabreichung von DT initiiert wurden, zeigten sich auch im Dünndarm erhöhte Werte GVHD-relevanter proinflammatorischer Zytokine. Moderate Unterschiede manifestierten sich im Expressionsmuster von TNF, welches sich in der DT-Gruppe im Vergleich zu unbehandelten Spendern durch eine signifikante Erhöhung auszeichnete. Ausgeprägter stellten sich die Unterschiede für INF- γ und MIP-2 dar. Die Gabe von DT führte in den untersuchten Proben zu hochsignifikant erhöhten Konzentrationen von INF- γ im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Das Expressionsniveau der anderen Gruppen betrug maximal 25% der für die DT-Gruppe bestimmten Werte. Ebenso verhielt es sich für MIP-2, welches in der DT-Gruppe deutlich über den Vergleichswerten der PBS-Gruppe und der Kontrollen lag (Faktor 2-6). Keine signifikanten Unterschiede wurden für die Expression von CCL-2 und IL-6 gefunden (Daten nicht gezeigt). Die normierten Konzentrationen an IL-17 waren anders als im Dickdarm in beiden experimentellen Gruppen gegenüber unbehandelten Spendern erniedrigt, unterschieden sich aber untereinander nicht signifikant.

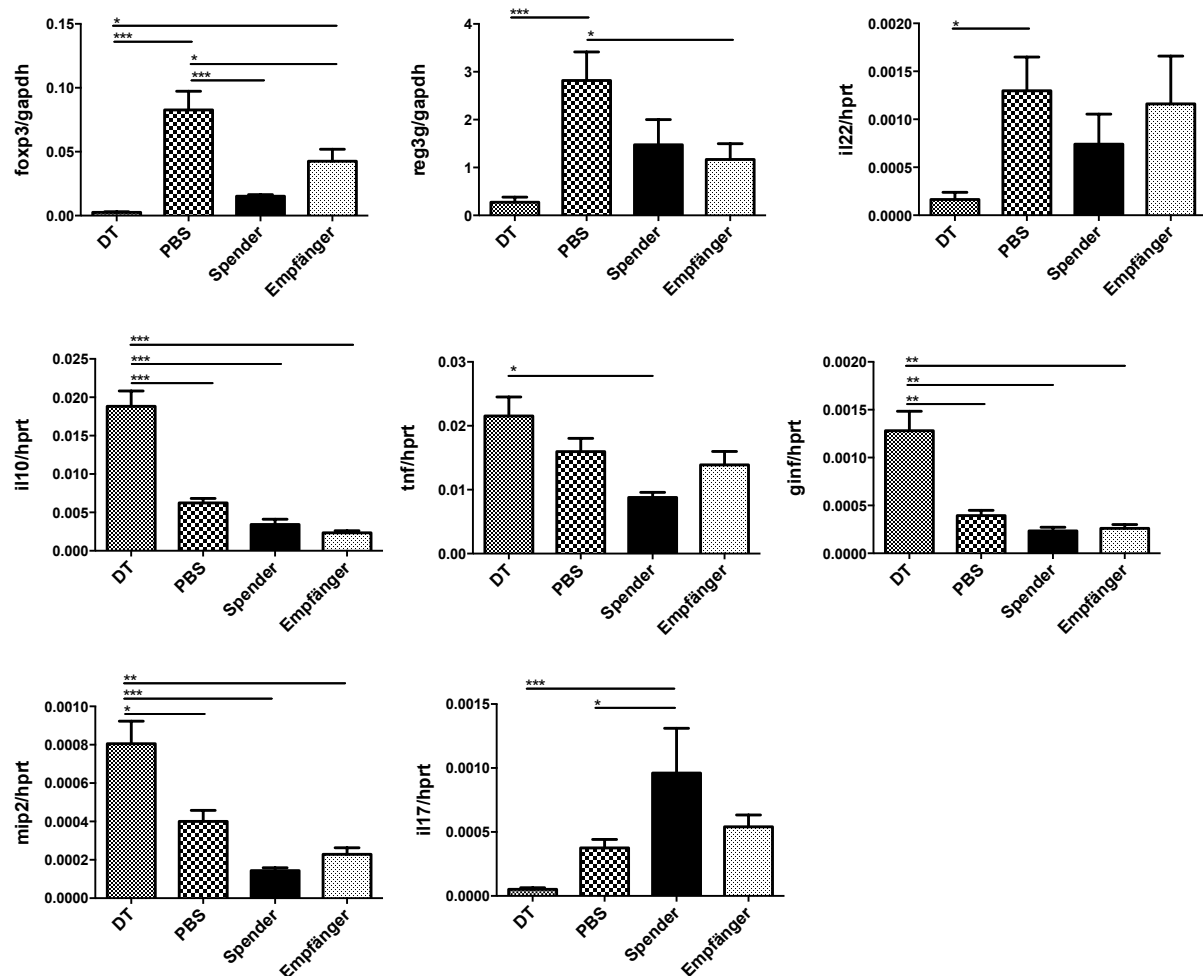


Abb. 16: Zytokinexpressionsprofil auf Transkriptionsebene im Dünndarm

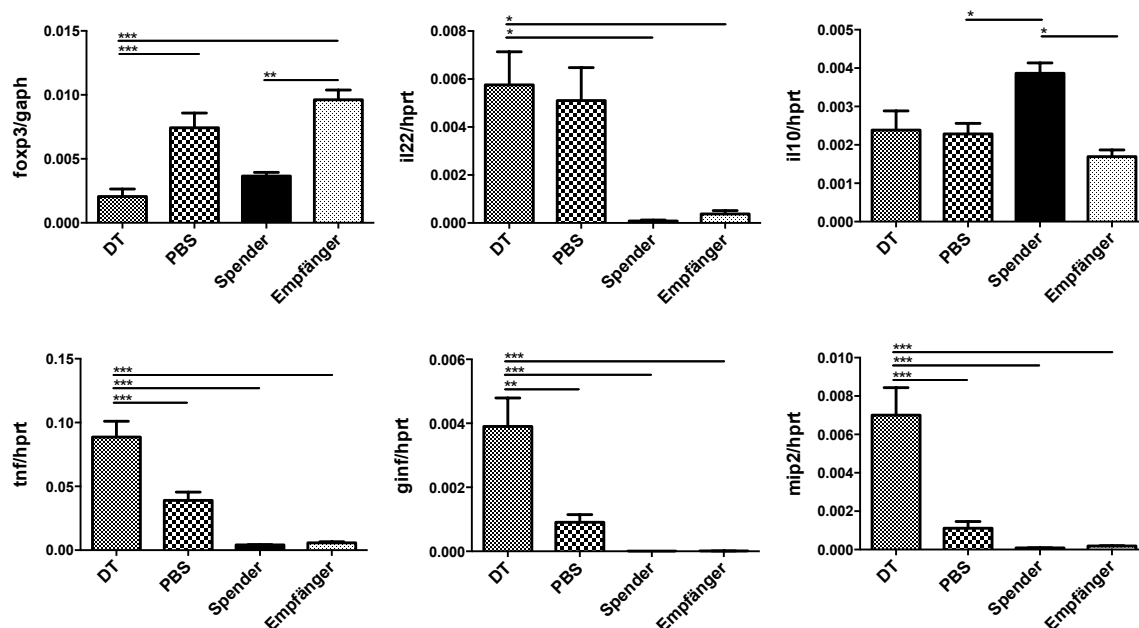
Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (feine Karos, $n=10-12$) oder PBS (Schachbrett, $n=6-8$). Dargestellt sind mittels qRT-PCR gemessene, normierte Expressionen einer Reihe GVHD-relevanter Zytokine im Dünndarm nach Organentnahme um d40 nach alloKMT. Als Referenz wurden entsprechende Konzentrationen auch in unbehandelten Spender (Foxp3DTRgfp, schwarz, $n=5-7$) und unbehandelten Empfängern (BALB/c, feine Punkte, $n=5-8$) untersucht. Für die PCR-Analysen wurden cDNA-Transkripte isolierter Gesamt-RNA jeweils doppelt eingesetzt und die Ergebnisse gemittelt. Als housekeeping-genes wurden je nach Angabe gapdh oder hprt verwendet. Die Fehlerbalken repräsentieren jeweils SEMs. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Die Daten stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

3.5.2 Kurzzeit

Analog zu den qRT-PCR-Analysen bei später Ausschaltung von Treg wurden bei früher DT-Depletion an d5, 7 und 9 und Aufarbeitung an d19 bzw. 20 die relativen Konzentrationen von GVHD-relevanten Zytokinen im Dick- (Abb. 17) und Dünndarm (Abb. 18) bestimmt. Übereinstimmend mit den bisherigen Ergebnissen konnten wir in Dickdärmen der DT-Gruppe eine signifikante Verringerung des Treg-Markers Foxp3 gegenüber Tieren der PBS-Gruppe

und unbehandelter Empfänger nachweisen. PBS-Tiere wiesen keine über die physiologischen Verhältnisse gesteigerten Expressionsraten auf. Die ermittelten Werte für IL-22 lagen in beiden experimentellen Gruppen in etwa auf demselben Niveau und waren gegenüber unmanipulierten Spendern und Empfängern um den Faktor 14 bis 69 erhöht. Für IL-10 konnten wir ähnliche Expressionsraten für die beiden experimentellen Gruppen und unbehandelte Empfänger nachweisen. Unbehandelte Spender zeigten eine stammspezifische Erhöhung der IL-10 Konzentrationen im Dickdarm mit signifikanten Erhöhungen gegenüber PBS-Tieren und unbehandelten Empfängern.

Die Analyse der klassisch proinflammatorischen Zytokine im Dickdarm belegte eine auffällige Verschiebung in Tieren, welchen zuvor DT appliziert worden war. So konnten wir hochsignifikant erhöhte Expressionen von TNF in der DT-Gruppe messen. PBS-Tiere wiesen etwa halb so hohe Zytokinlevel auf und Expressionsraten von unbehandelten Tieren lagen bei 4,7% bzw. 6,7% der für die DT-Gruppe bestimmten Werte. INF- γ war in der DT-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe um den Faktor 4 erhöht. Die gemessenen Konzentrationen in unbehandelten Tieren lagen im Vergleich zu DT-Tieren im Promillebereich. Alle Unterschiede erreichten mindestens hohe Signifikanz. Damit vereinbar detektierten wir Konzentrationen von MIP-2 in den Dickdärmen von Tieren der DT-Gruppe, welche die Konzentrationen der PBS-Gruppe etwa 7-fach und die unbehandelten Tiere zwischen 38 und 80-fach überstiegen. Ebenso drastische Erhöhungen fanden wir für das Chemokin CCL-2 und IL-6. Weiterhin fanden wir für IL-17 in der DT-Gruppe eine signifikante Erhöhung der Expression, die am eindrucklichsten im Vergleich zu unbehandelten Tieren ausfiel.



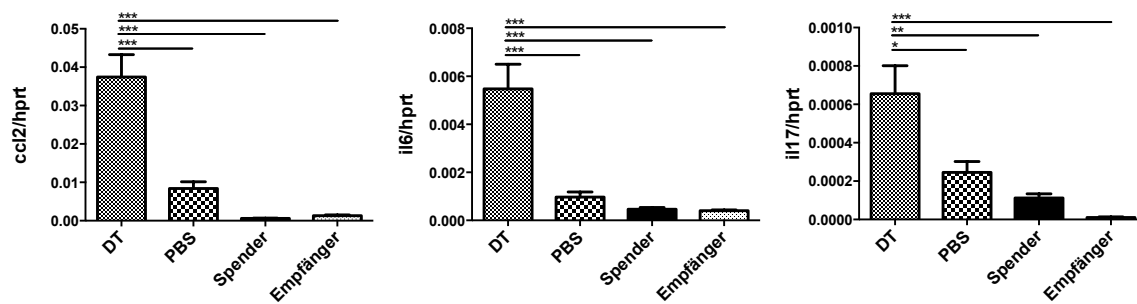


Abb. 17: Zytokinexpressionsprofil auf Transkriptionsebene im Dickdarm

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (feine Karos, $n=7-8$) oder PBS (Schachbrett, $n=8-10$). Dargestellt sind mittels qRT-PCR gemessene, normierte Expressionen einer Reihe GVHD-relevanter Zytokine im Dickdarm nach Organentnahme um d20 nach alloKMT. Als Referenz wurden entsprechende Konzentrationen auch in unbehandelten Spender (Foxp3DTRgfp, schwarz, $n=5$) und unbehandelten Empfängern (BALB/c, feine Punkte, $n=5$) untersucht. Für die PCR-Analysen wurden cDNA-Transkripte isolierter Gesamt-RNA jeweils doppelt eingesetzt und die Ergebnisse gemittelt. Als housekeeping-genes wurden je nach Angabe gapdh oder hprt verwendet. Die Fehlerbalken repräsentieren jeweils SEMs. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Im Dünndarm zeigten sich die Foxp3 Konzentration der DT-Gruppe nur mäßig gegenüber der PBS-Gruppe erniedrigt. Anders als bei später Treg-Depletion zeigten PBS-Tiere nur Foxp3-Level in der Größenordnung von unbehandelten Spendern. Die Expressionsraten von unbehandelten Empfängern waren demgegenüber um den Faktor 3 bis 19 erhöht und die gefundenen Unterschiede erreichten höchste Signifikanz. Ähnlich dem Szenario der späten DT-Applikation an d26, 28 und 30 konnten wir große Unterschiede im Expressionslevel von Reg3- γ feststellen. Diese waren aber in erster Linie auf eine Erhöhung der PBS-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen zurückzuführen (Faktor 4) und weniger auf einen übermäßigen Einbruch in der DT-Gruppe, die Werte in der Größenordnung unbehandelter Tiere aufwies. Keine signifikanten Unterschiede ergab die Analyse der Zytokine IL-22 und IL-10.

Die Analyse der proinflammatorischen Zytokine zeigte im Fall von TNF im Dünndarm keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Gruppen (Daten nicht gezeigt), jedoch starke Unterschiede im Expressionsprofil von INF- γ . Hier fanden wir hochsignifikant erhöhte Werte in der DT-Gruppe, welche in etwa dem 3-fachen der anderen Gruppen entsprachen. Die normierten Konzentrationen von MIP-2 waren im Dünndärmen der DT-Gruppe hochsignifikant gegenüber den unbehandelten Kontrollen erhöht (Faktor 4-6), jedoch nur diskret gegenüber PBS-Tieren. Auffällig war des Weiteren eine Erhöhung der

Expressionsrate von CCL-2 in Dünndarmlysaten der DT-Gruppe, welche mit doppelt bis 4-fach erhöhten Konzentrationen signifikante Unterschiede zu allen anderen Gruppen zeigte. Ähnliches konnte für die normierte Konzentration von IL-6 gezeigt werden. Auch hier übertrafen die bestimmten Expressionen in der DT-Gruppe alle Vergleichsgruppen um mindestens das Doppelte. Anders als im Dickdarm befand sich die normierte Konzentration von IL-17 im Dünndarm von Tieren der DT-Gruppe unter den Werten der anderen Gruppen, wobei nur der Vergleich mit unbehandelten Spendern einfache Signifikanz erreichte.

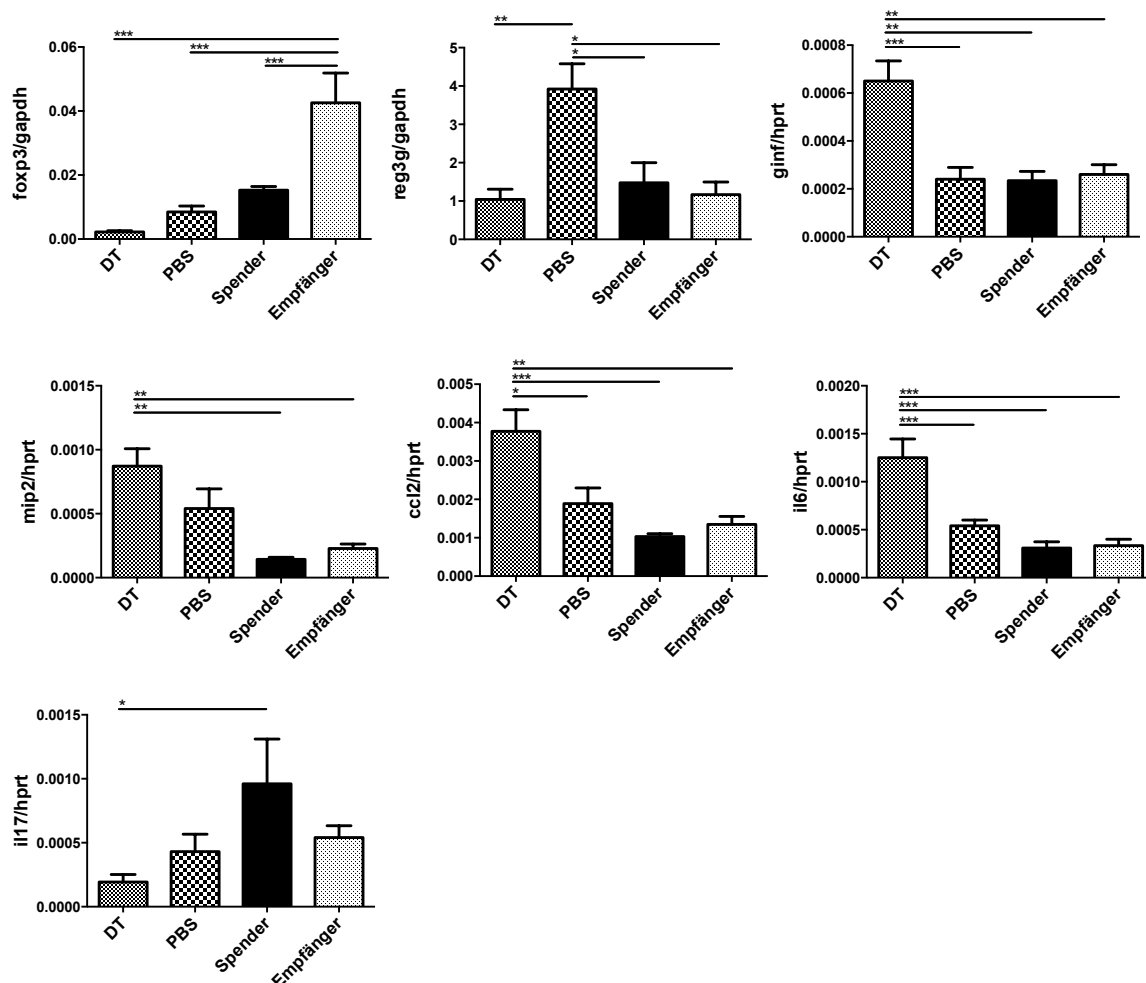


Abb. 18: Zytokinexpressionsprofil auf Transkriptionsebene im Dünndarm

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (feine Karos, $n=8$) oder PBS (Schachbrett, $n=9-10$). Dargestellt sind mittels qRT-PCR gemessene, normierte Expressionen einer Reihe GVHD-relevanter Zytokine im Dünndarm nach Organentnahme um d20 nach alloKMT. Als Referenz wurden entsprechende Konzentrationen auch in unbehandelten Spender (Foxp3DTRgfp, schwarz, $n=5-7$) und unbehandelten Empfängern (BALB/c, feine Punkte, $n=5-8$) untersucht. Für die PCR-Analysen wurden cDNA-Transkripte isolierter Gesamt-RNA jeweils doppelt eingesetzt und die Ergebnisse gemittelt. Als housekeeping-genes wurden je nach Angabe gapdh oder hprt verwendet. Die Fehlerbalken repräsentieren jeweils SEMs. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.6 Charakterisierung organinfiltrierender Leukozyten mittels Durchflusszytometrie

3.6.1 Langzeit

3.6.1.1 Analyse extraintestinaler Organe

3.6.1.1.1 Vorbemerkungen und Zellzahlen

Zur Charakterisierung organständiger Leukozyten wurden die wichtigsten Linien des adaptiven und angeborenen Immunsystems gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Eine Übersicht über immunphänotypische Markerprofile und das zur Identifizierung herangezogene Streulichtverhalten der beschriebenen Zellarten gibt nachfolgende Tabelle.

Antigen-Profil	Zelllinie
$\text{TCR}\beta^+ \text{FSC-A}^{\text{low}} \text{SSC-A}^{\text{low}}$	$\alpha\beta$ -T-Zelle
$\text{CD8}\alpha^+ \text{TCR}\beta^+ \text{FSC-A}^{\text{low}} \text{SSC-A}^{\text{low}}$	CD8^+ T-Zelle
$\text{CD4}^+ \text{TCR}\beta^+ \text{gfp}^- \text{FSC-A}^{\text{low}} \text{SSC-A}^{\text{low}}$	CD4^+ Tconv
$\text{CD4}^+ \text{TCR}\beta^+ \text{gfp}^+ \text{FSC-A}^{\text{low}} \text{SSC-A}^{\text{low}}$	Regulatorische T-Zelle / Treg
$\text{CD19}^+ \text{FSC-A}^{\text{low}} \text{SSC-A}^{\text{low}}$	B-Zelle
$\text{CD11b}^+ \text{Gr-1}^+$ oder $\text{CD11b}^+ \text{Ly-6G}^+$	Granulozyt
$\text{CD11b}^+ \text{Gr-1}^-$ oder $\text{CD11b}^+ \text{Ly-6G}^-$	Monozyt

Tab. 6: Markerprofile und Streulichtverhalten untersuchter Zelllinien in der FACS-Analyse

Zum Analysezeitpunkt waren die Leukozyten aus allen untersuchten Gewebe positiv für den Oberflächenmarker H-2K^b, was auf deren vollständige Rekonstitution aus dem Spenderknochenmark hinweist. Die Gesamtzellzahl isolierter Leukozyten war in den Milzen der DT-Gruppe geringfügig gegenüber der PBS-Gruppe erniedrigt. Beide Werte blieben weit hinter den Zellzahlen unbehandelter Spender zurück (DT: $29,96 \pm 6,41 \times 10^6$, PBS: $32,54 \pm 4,46 \times 10^6$, Spender: $104,5 \pm 13,6 \times 10^6$). Im Knochenmark lagen die Zellzahlen der experimentellen Gruppen nur moderat unter den für unbehandelte Spender gefundenen Werten. Die Unterschiede erreichten keine Signifikanz (DT: $22,1 \pm 2,23 \times 10^6$, PBS: $21,89 \pm 2,79 \times 10^6$, Spender: $31,5 \pm 4,66 \times 10^6$). Für die gepoolten peripheren und mesenterialen Lymphknoten der beiden Versuchsgruppen detektierten wir eine ähnliche Zellularität. Gegenüber unbehandelten Spendern fiel eine ausgeprägte Zytopenie auf (DT: $0,56 \pm 0,23 \times 10^6$, PBS: $0,41 \pm 0,08 \times 10^6$, Spender: $7,48 \pm 1,61 \times 10^6$).

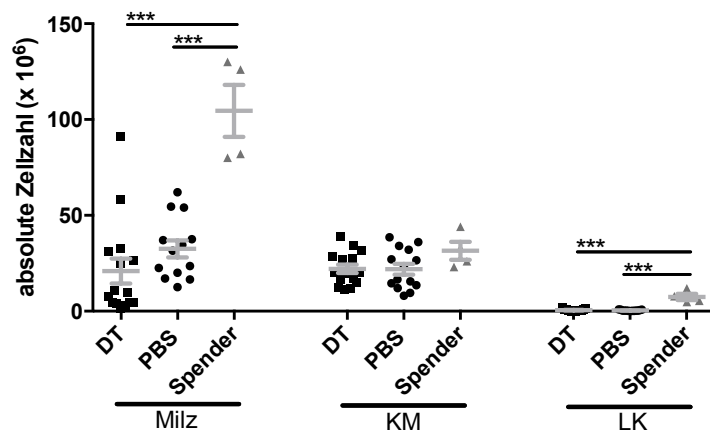


Abb. 19: Absolute Zellzahlen reisolierter Leukozyten der Milz, des Knochenmarks und gepoolter peripherer und mesenterialer Lymphknoten

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=14-15$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=13-14$). Dargestellt sind absolute Zellzahlen reisolierter Leukozyten zum Analysezeitpunkt um d40 aus vier unabhängigen Experimenten. Unbehandelte *Foxp3DTRgfp*-Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

3.6.1.1.2 Organinfiltrierende Leukozyten der Milz

Die beiden experimentellen Gruppen unterschieden sich nur unwesentlich im prozentualen Anteil der T-Zellen unter allen isolierten Leukozyten. Im Vergleich zu unbehandelten Spendern fiel eine relative Armut dieser Zelllinie auf. Unterschiede zwischen der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern waren signifikant (DT: $20,31 \pm 2,04\%$, PBS: $17,3 \pm 1,64\%$, Spender: $29,41 \pm 1,45\%$). Die Gegenüberstellung der Gruppen in absoluten Zellzahlen zeigte eine deutliche Verminderung der Zellularität in den ähnlich zytopenen Versuchsgruppen gegenüber unbehandelten Spendern (DT: $4,02 \pm 1,34 \times 10^6$, PBS: $5,93 \times 1,10 \times 10^6$, Spender: $30,34 \pm 3,11 \times 10^6$).

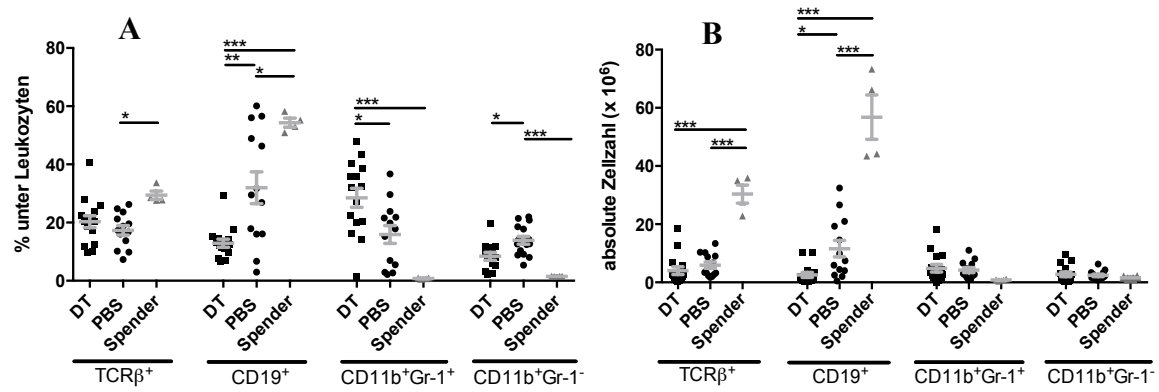


Abb. 20: Leukozytäre Zusammensetzung der Milz

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=13-15$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=13-15$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus vier unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

In der weiteren Analyse wurde eine auffällige Verschiebung innerhalb des T-Zellkompartiments deutlich. In der DT-Gruppe zeigte sich gegenüber der PBS-Gruppe eine Zunahme des Anteils $CD8^+$ T-Zellen auf Werte in der Größenordnung unbehandelter Spender (DT: $38,99 \pm 1,95\%$, PBS: $28,86 \pm 1,18\%$, Spender: $39,93 \pm 0,76\%$). In absoluten Zellzahlen entsprachen die Werte der beiden Versuchsgruppen weiterhin nur etwa $\frac{1}{8}$ der Anzahl $CD8^+$ T-Lymphozyten in unbehandelten Spendern (DT: $1,52 \pm 0,50 \times 10^6$, PBS: $1,62 \pm 0,28 \times 10^6$, Spender: $12,06 \pm 1,09 \times 10^6$). Wir fanden keine signifikanten Unterschiede in den prozentualen Anteilen von $CD4^+$ Tconv in allen drei untersuchten Gruppen, was sich in einem auffälligen Mangel an diesem Subset in den Versuchsgruppen niederschlug (DT: $2,42 \pm 0,82 \times 10^6$, PBS: $3,58 \pm 0,39 \times 10^6$, Spender: $15,14 \pm 1,55 \times 10^6$). Die Injektion von DT führte zu einer bis zum Analysezeitpunkt nachweisbaren Depletion von Spender-Treg. Prozentuale Unterschiede sowie Differenzen ihrer tatsächlichen Zellzahlen waren jeweils hochsignifikant. Tiere der PBS-Gruppe zeigten eine gegenüber unmanipulierten Spendern eindrücklich erhöhte Fraktion unter allen T-Zellen. Der Vergleich der absoluten Zellzahlen belegte aber einen weiterhin manifesten Mangel dieser Zelllinie (DT: $0,67 \pm 0,13\%$ entsprechend $0,02 \pm 0,006 \times 10^6$, PBS: $10,35 \pm 0,55\%$ entsprechend $0,61 \pm 0,12 \times 10^6$, Spender: $5,64 \pm 0,36\%$ entsprechend $1,74 \pm 0,27 \times 10^6$).

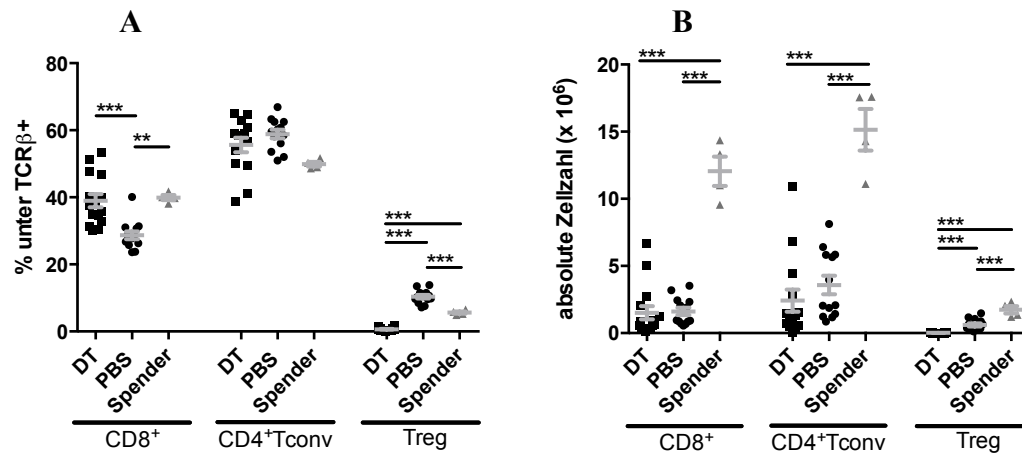


Abb. 21: T-Zell-Subsets der Milz

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=14-15$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=13$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter T-Zellen (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus vier unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

In der DT-Gruppe fiel eine hochsignifikante prozentuale Verringerung von B-Zellen gegenüber den anderen beiden Gruppen auf (DT: $12,89 \pm 1,42\%$, PBS: $31,98 \pm 5,48\%$, Spender: $54,33 \pm 1,56\%$). Die absoluten Zellzahlen spiegelten die partielle Regeneration des B-Zell-Kompartiments in der PBS-Gruppe wider und zeigten signifikant höhere Werte als in der DT-Gruppe. Dennoch unterschieden sich beide Gruppe noch stark von unbehandelten Spendern (DT: $2,58 \pm 0,85 \times 10^6$, PBS: $11,59 \pm 2,86 \times 10^6$, Spender: $56,78 \pm 7,63 \times 10^6$).

Daneben führte die Injektion von DT zu einem signifikanten Auswachsen von Granulozyten sowohl im Vergleich zur PBS-Gruppe, als auch gegenüber unbehandelten Spendern (DT: $28,49 \pm 3,25\%$, PBS: $15,90 \pm 3,09\%$, Spender: $0,77 \pm 0,11\%$). Der absolute Zellgehalt an Granulozyten lag in beiden Versuchsgruppen auf ähnlich hohem Niveau und deutlich über dem Referenzwert unbehandelter Spender. Die Streuung der Einzelwerte verhinderte allerdings eine Signifikanz der gefundenen Differenzen (DT: $4,85 \pm 1,30 \times 10^6$, PBS: $4,25 \pm 0,85 \times 10^6$, Spender: $0,82 \pm 0,16 \times 10^6$). Weiterhin zeigte sich in der DT-Gruppe eine prozentuale Verminderung von Monozyten gegenüber der PBS-Gruppe. Beide Versuchsgruppen zeigten erheblich erhöhte Anteile gegenüber unbehandelten Spendern (DT: $8,40 \pm 1,35\%$, PBS: $13,89 \pm 1,35\%$, Spender: $1,52 \pm 0,04\%$). In absoluten Zellzahlen ergab die Analyse der Monozyten ein ähnliches Bild wie für die Granulozyten beschrieben.

3.6.1.1.3 Organinfiltrierende Leukozyten im Knochenmark

Im Knochenmark war der Anteil an T-Zellen unter kernhaltigen Zellen in allen untersuchten Gruppen auf einem charakteristisch niedrigem Niveau, wobei ein Trend zu größeren Anteilen in der DT-Gruppe deutlich wurde (DT: $3,59 \pm 0,29\%$, PBS: $2,34 \pm 0,51\%$, Spender: $2,62 \pm 0,34\%$). In absoluten Zellzahlen übertrafen Tiere der DT-Gruppe und unbehandelte Spender die PBS-Gruppe um mindestens das Doppelte. Unterschiede waren jeweils signifikant (DT: $0,78 \pm 0,09 \times 10^6$, PBS: $0,38 \pm 0,05 \times 10^6$, Spender: $0,87 \pm 0,35 \times 10^6$).

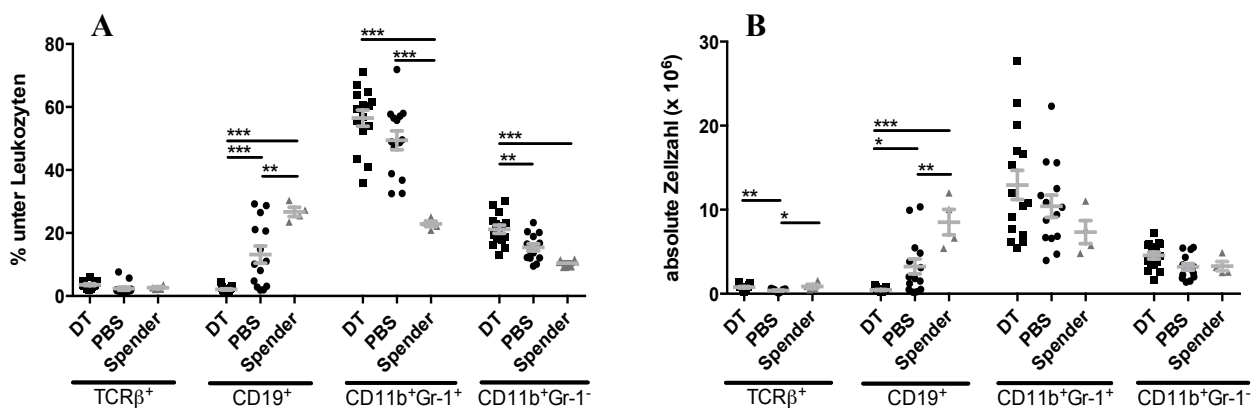


Abb. 22: Leukozytäre Zusammensetzung des Knochenmarks

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=15$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=13-14$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus vier unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

CD8⁺ Lymphozyten bildeten in allen untersuchten Gruppen vergleichbare Fraktionen innerhalb des T-Zellkompartiments und die Absolutwerte ähnelten sich ($46,12 \pm 1,86\%$ – $49,05 \pm 1,89\%$ entsprechend $0,22 \pm 0,04 \times 10^6$ – $0,44 \pm 0,14 \times 10^6$). In der DT-Gruppe zeigte sich ein auffälliges Auswachsen von CD4⁺ Tconv gegenüber der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern. Ihr Anteil überstieg mit $49,01 \pm 1,92\%$ in der DT-Gruppe deutlich die Werte von PBS-Tieren ($32,18 \pm 2,92\%$) und unbehandelten Spendern ($16,3 \pm 1,55\%$). Die veränderten prozentualen Anteile fanden ihren Niederschlag in signifikant erhöhten absoluten Zellzahlen (DT: $0,39 \pm 0,05 \times 10^6$, PBS: $0,12 \pm 0,08 \times 10^6$, Spender: $0,15 \pm 0,05 \times 10^6$).

Treg waren erwartungsgemäß in der DT-Gruppe nahezu vollständig eradiziert. Prozentuale Anteile unter allen T-Zellen und absolute Zellzahlen unterschieden sich hochsignifikant von

den anderen beiden Gruppen. Ähnlich wie in der Milz stellten Treg in der PBS-Gruppe im Vergleich zu unbehandelten Spendern prozentual größere Populationen innerhalb des T-Zellkompartiments, wiesen aber absolut geringere Zellzahlen auf.

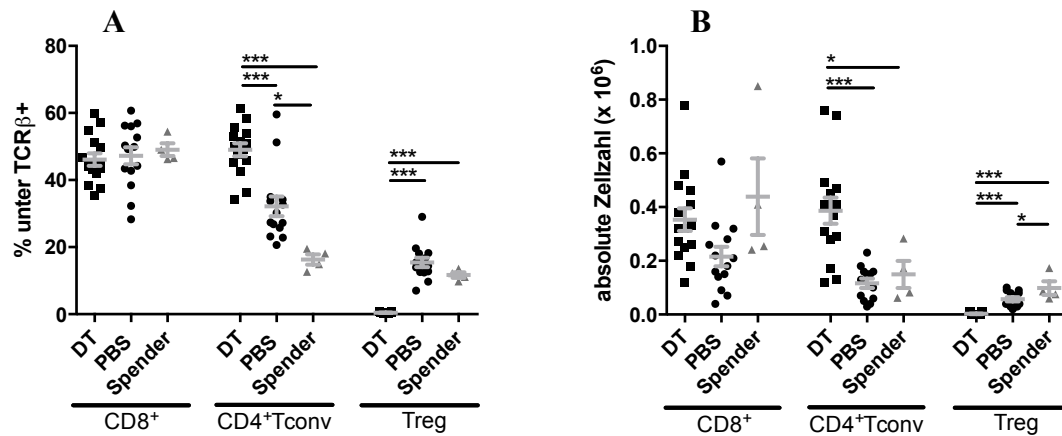


Abb. 23: T-Zell-Subsets des Knochenmarks

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=15$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=13-14$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter T-Zellen (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus vier unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die B-Zellen zeigten sich in der DT-Gruppe stark gegenüber den beiden anderen Gruppen supprimiert. Ihr prozentualer Anteil unterschritt mit durchschnittlich $2,10 \pm 0,23\%$ signifikant die gefundenen Werte in der PBS-Gruppe ($13,19 \pm 2,74\%$) und unbehandelten Spender ($26,68 \pm 1,46\%$). In absoluten Zellzahlen fanden wir entsprechende Befunde. Minimale Werte wurden in der DT-Gruppe detektiert. Die Zellzahlen lagen signifikant unter der PBS-Gruppe, welche ihrerseits hinter unbehandelten Spendern zurückblieb, aber bereits Anzeichen der Erholung nach durchgemachter Konditionierung zeigte (DT: $0,45 \pm 0,06 \times 10^6$, PBS: $3,25 \pm 0,90 \times 10^6$, Spender: $8,52 \pm 1,52 \times 10^6$).

Gleichzeitig übertrafen die prozentualen Anteile von Granulozyten unter allen reisolierten Leukozyten auf höchster Signifikanzstufe in beiden experimentellen Gruppen die der unbehandelten Tiere (DT: $56,47 \pm 2,55\%$, PBS: $49,44 \pm 3,01\%$, Spender: $22,9 \pm 0,89\%$). Dieser Befund blieb bei einer analogen Tendenz ohne signifikante Entsprechung in absoluten Zellzahlen. Für Monozyten fanden wir in der DT-Gruppe signifikant erhöhte Fraktionen gegenüber der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern (DT: $21,2 \pm 1,29\%$, PBS: $15,43 \pm$

1,11, Spender: $10,41 \pm 0,46\%$). Auch hier blieben die Absolutwerte aber vergleichbar ($3,2 \pm 0,39 \times 10^6 - 4,55 \pm 0,41 \times 10^6$).

3.6.1.1.4 Organinfiltrierende Leukozyten der Lymphknoten

Die Analyse der gepoolten Lymphknoten (mesenteriale, axilläre und inguinale Lymphknoten) zeigte in der DT-Gruppe in der Tendenz einen prozentual höheren T-Zellgehalt (DT: $64,14 \pm 5,02\%$, PBS: $55,87 \pm 2,80$, Spender: $56,68 \pm 2,27\%$). In absoluten Zellzahlen stellten wir jedoch in den Versuchsgruppen eine hochsignifikante Verringerung von T-Zellen fest (DT: $0,43 \pm 0,14 \times 10^6$, PBS: $0,23 \pm 0,04 \times 10^6$, Spender: $4,20 \pm 0,88 \times 10^6$).

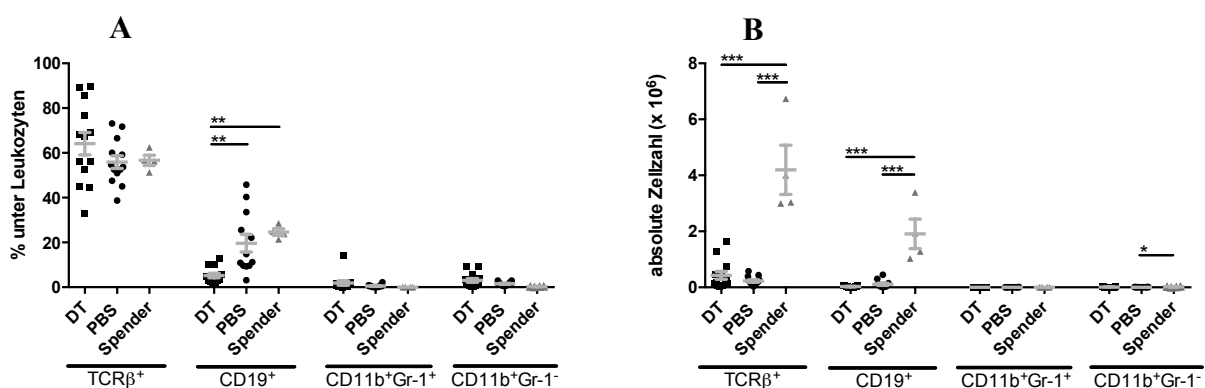


Abb. 24: Leukozytäre Zusammensetzung der gepoolten peripheren und mesenterialen Lymphknoten

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=13$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=12-13$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus vier unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Innerhalb des T-Zellkompartiments fiel eine deutliche Zunahme des Anteils CD8⁺ Lymphozyten in der DT-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe auf. Die prozentuale Anteile waren in der DT-Gruppe und unbehandelten Spendern vergleichbar (DT: $41,45 \pm 3,28\%$, PBS: $21,63 \pm 0,72$, Spender: $37,4 \pm 1,45\%$). CD4⁺ Tconv trugen in allen Gruppen in vergleichbaren Größenordnungen zur Bildung des T-Zellkompartiments bei. Erwartungsgemäß fanden wir nach DT-Gabe nur noch minimale Anteile von Treg in behandelten Tieren. In der PBS-Gruppe dagegen konnten wir in etwa doppelt so hohe Anteile wie in unbehandelten Spendern nachweisen (DT: $0,64 \pm 0,14\%$, PBS: $13,07 \pm 1,16\%$, Spender: $6,31 \pm 0,49\%$).

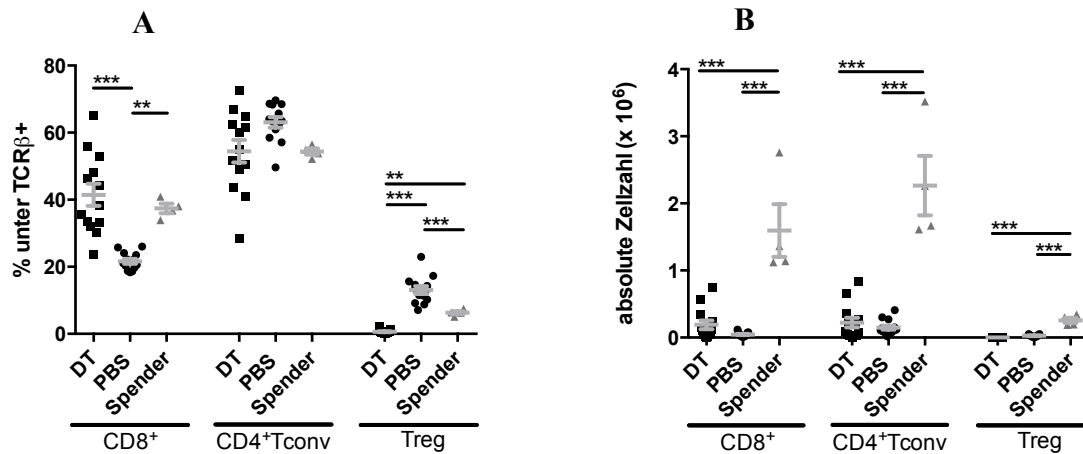


Abb. 25: T-Zell-Subsets der gepoolten peripheren und mesenterialen Lymphknoten

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=13$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=13$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter T-Zellen (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus vier unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Des Weiteren führte die Behandlung mit DT auch in den Lymphknoten zu einer signifikanten Reduktion des Anteils von B-Zellen gegenüber Tieren der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern (DT: $5,20 \pm 0,98\%$, PBS: $19,65 \pm 3,98\%$, Spender: $24,63 \pm 1,48\%$). Auf absolute Zellzahlen berechnet ergaben sich im Vergleich zur Kontrolle hochsignifikant verminderte Werte für beide Versuchsgruppen (DT: $0,03 \pm 0,007 \times 10^6$, PBS: $0,11 \pm 0,04 \times 10^6$, Spender: $1,91 \pm 0,53 \times 10^6$). Die Analyse der Granulozyten und Monozyten zeigte keine nennenswerten Auffälligkeiten.

3.6.1.1.5 Zusammenfassung

Die durchflusszytometrischen Analysen der Immunorgane Milz, Knochenmark und Lymphknoten zeigen bei Treg-depletierten Tieren einige auffällige Befunde. Wir konnten eine markant verringerte Zellularität der experimentellen Gruppen in der Milz und den Lymphknoten beschreiben, die im Wesentlichen auf die Armut an Zellen des adaptiven Schenkels der Immunabwehr – T-Zellen und B-Zellen – zurückzuführen ist. Eine nahezu vollständige Eradikation von B-Zellen und Treg in allen untersuchten Geweben hat sich als ein Charakteristikum der DT-Gruppe herausgestellt. Gleichzeitig fanden wir zwischen den einzelnen Gruppen Unterschiede in der Zellzusammensetzung des T-Zellrepertoires in allen untersuchten Geweben. In Knochenmärgern und Milzen imponierte vor allem in der

DT-Gruppe, aber auch der PBS-Gruppe, ein prozentualer Anstieg von proinflammatorischen Granulozyten im Vergleich zu Kontrolltieren.

3.6.1.2 Analyse des Dick- und Dünndarms

3.6.1.2.1 Vorbemerkungen und Zellzahlen

Analog zu den durchflusszytometrischen Untersuchungen der extraintestinalen Immunorgane Milz, Knochenmark und Lymphknoten, wurden organinfiltrierende Leukozyten aus dem Dick- und Dünndarm isoliert, quantifiziert und immunphänotypisiert. Aufgrund bedeutender immunologisch-funktioneller Unterschiede differenzierten wir zwei grundsätzlich distikte Kompartimente: die interstitiellen Leukozyten der Lamina Propria (Lamina Propria Lymphozyten, LPL) und die luminal gelegenen Leukozyten mit enger Nachbarschaft zur einschichtigen Epithelauskleidung (intraepitheliale Lymphozyten, IEL).

Die gemittelten Zellzahlen der LPL des Dickdarms lagen in der DT-Gruppe mit $8,2 \pm 0,68 \times 10^6$ Zellen hochsignifikant über der PBS-Gruppe ($3,17 \pm 0,61 \times 10^6$) und unbehandelten Spendern ($0,90 \pm 0,14 \times 10^6$) bzw. Empfängern ($1,78 \pm 0,36 \times 10^6$). Die Zellularitäten des Dünndarms lagen durchgehend über denen des Dickdarms. Die DT-Gruppe zeichnete sich durch erhöhte Mengen infiltrierender Leukozyten auf, wobei die Einzelwerte sehr stark streuten (DT: $17,20 \pm 4,14 \times 10^6$, PBS: $10,79 \pm 2,90 \times 10^6$, Spender: $3,91 \pm 1,28 \times 10^6$, Empfänger: $15,93 \pm 2,67 \times 10^6$).

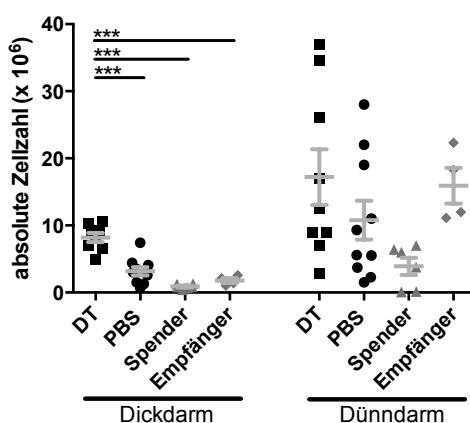


Abb. 26: Absolute Zellzahlen reisolierter Leukozyten aus der Lamina Propria von Dick- und Dünndarm

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=10$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=10$). Dargestellt sind absolute Zellzahlen reisolierter Leukozyten zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der Versuchsgruppen entsprechen Einzelwerten. Daten unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von

$2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Aufgrund des teilweise anders gearteten Leukozytenrepertoires im einschichtigen Epithelverband der gastrointestinalen Oberflächen wurden die Färbepanels der LPL für die durchflusszytometrische Analyse der IEL modifiziert. Anstelle von B-Zellen, die ausschließlich subepithelial anzutreffen sind, wurde das Vorkommen von epithelständigen $\text{TCR}\gamma\delta^+$ T-Zellen charakterisiert. Außerdem wurde der besonderen Komposition von $\text{TCR}\beta^+\text{CD8}^+$ Lymphozyten durch simultane Färbung der $\text{CD8}\alpha$ - und $\text{CD8}\beta$ -Untereinheiten Rechnung getragen.

Ähnlich wie in der Lamina Propria beobachteten wir im Epithel von DT-behandelten Tieren einen massiven Influx von Entzündungszellen. Der Vergleich der am Mikroskop quantifizierten Leukozyten zeigte in Dickdärmen der DT-Gruppe mit $5,62 \pm 0,75 \times 10^6$ Zellen im Vergleich zu den anderen Gruppen 5 bis 7-fache Zellgehalte (PBS: $0,85 \pm 0,33 \times 10^6$, Spender: $0,89 \pm 0,27 \times 10^6$ Empfänger: $1,04 \pm 0,22 \times 10^6$). Alle Unterschiede gegenüber der DT-Gruppe erreichten die höchste Signifikanzstufe. Im Dünndarm lag die Zellausbeute in der DT-Gruppe mit im Mittel $35,58 \pm 6,55 \times 10^6$ gezählten Zellen deutlich über den Werten der anderen Gruppen. Unterschiede gegenüber der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern wurden trotz starker Streuung der Einzelwerte signifikant (PBS: $14,16 \pm 2,89 \times 10^6$, Spender: $16,76 \pm 3,18 \times 10^6$, Empfänger: $16,61 \pm 2,08 \times 10^6$).

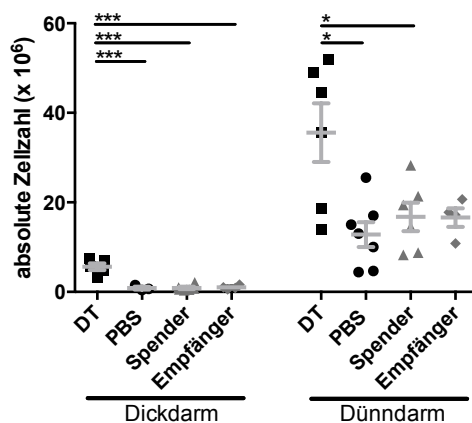


Abb. 27: Absolute Zellzahlen reisolierter Leukozyten aus dem Schleimhautepithel von Dick- und Dünndarm

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=5-6$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=3-6$). Dargestellt sind absolute Zellzahlen reisolierter Leukozyten zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Daten der PBS-Gruppe und unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus

vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Alle Zellen exprimierten als Korrelat ihrer vollständigen Rekonstitution aus Spenderknochenmark am Tag der Analyse (d39 und 40) einheitlich H-2K^b. Eine Übersicht über untersuchte Zelllinien, sowie deren Markerprofil und Streulichtverhalten gibt die nachfolgende Tabelle.

Antigen-Profil	Zelllinie
CD45 ⁺ TCRβ ⁺ FSC-A ^{low} SSC-A ^{low}	αβ-T-Zelle
CD45 ⁺ TCRβ ⁺ CD8α ⁺ FSC-A ^{low} SSC-A ^{low}	CD8 ⁺ T-Zelle*
CD45 ⁺ TCRβ ⁺ CD8α ⁺ CD8β ⁻ FSC-A ^{low} SSC-A ^{low}	CD8αα ⁺ T-Zelle*
CD45 ⁺ TCRβ ⁺ CD8α ⁻ CD4 ⁻ FSC-A ^{low} SSC-A ^{low}	DN ⁻ T-Zelle
CD45 ⁺ TCRβ ⁺ CD4 ⁺ gfp ⁻ FSC-A ^{low} SSC-A ^{low}	CD4 ⁺ Tconv
CD45 ⁺ TCRβ ⁺ CD4 ⁺ gfp ⁺ FSC-A ^{low} SSC-A ^{low}	Regulatorische T-Zelle / Treg
CD45 ⁺ TCRγδ ⁺ FSC-A ^{low} SSC-A ^{low}	γδ-T-Zelle*
CD45 ⁺ TCRβ ⁻ CD11b ⁻ B220 ⁺ FSC-A ^{low} SSC-A ^{low}	B-Zelle
CD45 ⁺ CD11b ⁺ Gr-1 ⁺	Granulozyt
CD45 ⁺ CD11b ⁺ Gr-1 ⁻	Monozyt

Tab. 7: Übersicht gefärbter Zelllinien und zugehöriger durchflusszytometrischer Charakteristika

* kein Vorkommen in LPL, Färbung deshalb nur in IEL

3.6.1.2.2 Organinfiltrierende Leukozyten der Lamina Propria

Die nähere Klassifizierung der Leukozyten zeigte eine Verschiebung der Zellzusammensetzung mit einer eindrücklichen Dominanz von T-Zellen in Dickdärmen der DT-Gruppe. Ihr prozentualer Anteil betrug im Mittel $62,7 \pm 2,86\%$, wohingegen in der PBS-Gruppe mit $36,1 \pm 3,11\%$ nur halb so hohe Werte detektiert wurden. T-Zellen in unbehandelten Spendern machten $9,31 \pm 0,96\%$ an allen Leukozyten aus, in unbehandelten Empfängern $15,0 \pm 2\%$. Die Ausbeute an T-Zellen überstieg in der DT-Gruppe die anderen Gruppen um den Faktor 4 bis 54 (DT: $4,83 \pm 0,58 \times 10^6$, PBS: $1,25 \pm 0,29 \times 10^6$, Spender: $0,09 \pm 0,02 \times 10^6$, Empfänger: $0,29 \pm 0,08 \times 10^6$). Die Unterschiede waren jeweils gegenüber der DT-Gruppe hochsignifikant.

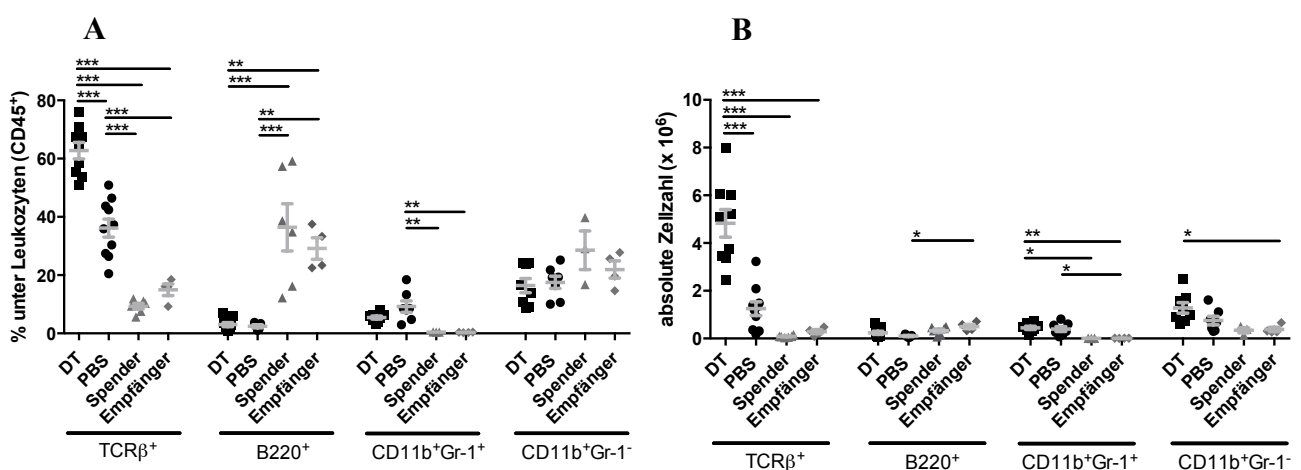


Abb. 28: Leukozytäre Zusammensetzung der Lamina Propria des Dickdarms

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n = 8-9$) oder PBS (schwarze Kreise, $n = 5-10$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten.

Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=3-6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der Versuchsgruppen entsprechen Einzelwerten. Daten unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Es zeigte sich bei näherer Betrachtung des T-Zellkompartiments eine Verschiebung der Zellzusammensetzung in der DT-Gruppe im Sinne einer Expansion von DN⁺ Lymphozyten. Ihr Anteil belief sich unter allen reisolierten T-Zellen auf $44,5 \pm 3,27\%$ und unterschied sich hochsignifikant von der PBS-Gruppe ($24,8 \pm 2,77\%$) und unbehandelten Empfängern ($26,5 \pm 1,67\%$). Legt man die Dominanz DN⁺ Lymphozyten in der DT-Gruppe und die grundsätzlich geringere Zellularität unbehandelter Tiere zugrunde, ergaben sich in absoluten Zahlen hochsignifikante Unterschiede im Vergleich der DT-Tiere mit allen andern Gruppen (DT: $2,25 \pm 0,39 \times 10^6$, PBS: $0,29 \pm 0,07 \times 10^6$, Spender: $0,03 \pm 0,01 \times 10^6$, Empfänger: $0,08 \pm 0,02 \times 10^6$). Wir detektierten keine CD8⁺ Lymphozyten innerhalb des T-Zellkompartiments.

CD4⁺ Tconv machten in allen Gruppen in etwa die Hälfte aller T-Zellen aus (DT: $51,3 \pm 3,67\%$, PBS: $53,8 \pm 3,29\%$, Spender $44,9 \pm 3,60\%$, Empfänger: $56,4 \pm 3,53\%$). Die absoluten Zellzahlen von CD4⁺ Tconv überstiegen jedoch trotz einiger Streuung in der DT-Gruppe deutlich die entsprechenden Werte der PBS-Gruppe und unbehandelter Kontrollen (DT: $2,49 \pm 0,36 \times 10^6$, PBS: $0,69 \pm 0,16 \times 10^6$, Spender: $0,04 \pm 0,01 \times 10^6$, Empfänger: $0,16 \pm 0,04 \times 10^6$). Für alle Vergleiche gegenüber der DT-Gruppe wurde höchste Signifikanz errechnet.

Wie nach der immunhistochemischen Untersuchung von Treg in Gewebeschnitten nicht anders zu erwarten, zeigte die FACS-Untersuchung eine Eradikation von Treg in der DT-Gruppe. Ihre Frequenz innerhalb des T-Zellpools betrug mit $0,43 \pm 0,04\%$ signifikant weniger als in der PBS-Gruppe und in unbehandelten Kontrollen (PBS: $19,1 \pm 2,18\%$, Spender: $18,3 \pm 2,86\%$, Empfänger: $16,5 \pm 2,38\%$).

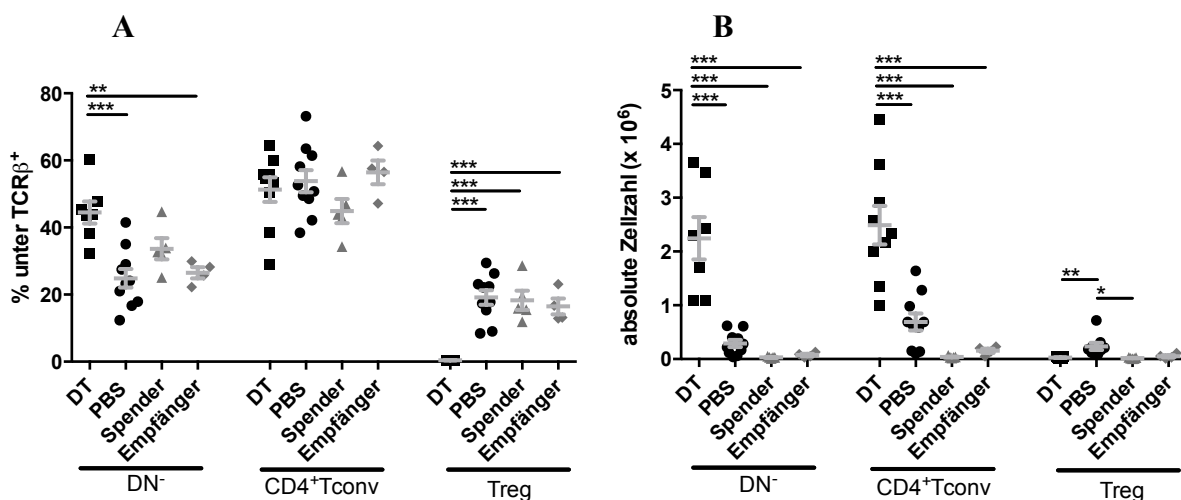
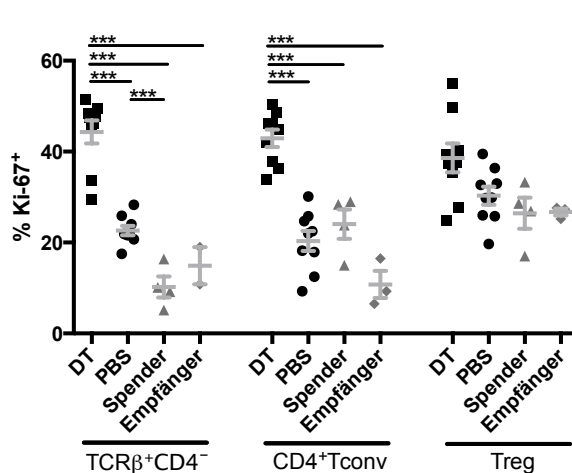


Abb. 29: Subklassifizierung der Lamina Propria-ständigen T-Zellen des Dickdarms

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=7-9$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=9-10$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter T-Zellen (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=5$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der Versuchsgruppen entsprechen Einzelwerten. Daten unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Durch Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 wurde das Proliferationsverhalten von T-Zell-Subsets untersucht. TCR β^+ CD4 $^-$ Zellen, in der Lamina Propria DN $^-$ Lymphozyten entsprechend, zeigten in der DT-Gruppe eine etwa doppelt so hohe Fraktion Ki-67 $^+$ Lymphozyten wie in der PBS-Gruppe und ca. 3-fach erhöhte Werte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (DT: $44,3 \pm 2,51\%$, PBS: $22,6 \pm 10,4\%$, Spender: $10,2 \pm 2,32\%$, Empfänger: $14,9 \pm 4,1\%$). Weiterhin zeigten CD4 $^+$ Tconv mit $42,9 \pm 1,92\%$ in der DT-Gruppe eine hochsignifikant erhöhte Teilungsaktivität im Vergleich zu allen anderen Gruppen (PBS: $20,3 \pm 2,19\%$, Spender: $24,1 \pm 3,23\%$, Empfänger: $10,8 \pm 2,97\%$).

Die in geringen Mengen nachweisbaren Treg der DT-Gruppe exprimierten zu $38,6 \pm 3,17\%$ den Teilungsmarker und lagen damit nachweisbar, aber nicht statistisch signifikant über den anderen Gruppen (PBS: $30,3 \pm 1,99\%$, Spender: $26,5 \pm 3,43\%$, Empfänger: $26,7 \pm 7,6\%$).

**Abb. 30: Untersuchung des Teilungsverhaltens Lamina Propria-ständiger T-Zellen des Dickdarms**

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=9$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=9$). Dargestellt ist der prozentuale Anteil proliferierender Lymphozyten, gemessen anhand der Expression des Teilungsmarkers Ki-67, zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=4$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=2-3$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der Versuchsgruppen entsprechen Einzelwerten. Daten unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

SEMs. Datenpunkte der Versuchsgruppen entsprechen Einzelwerten. Daten unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die immunphänotypische Untersuchung von Zellen außerhalb des T-Zellkompartiments zeigte folgendes Bild: B-Zellen waren in den Versuchsgruppen, ähnlich wie in anderen Organen, deutlich erniedrigt und trugen nur marginal zur Zusammensetzung residenter Leukozyten bei (DT: $3,02 \pm 0,69\%$, PBS: $2,43 \pm 0,53\%$). Gleichzeitig stellten B-Zellen in unmanipulierten Tieren die vorherrschende Zelllinie dar. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und unbehandelten Tieren waren hochsignifikant (Spender: $36,4 \pm 8,07\%$, Empfänger: $29,2 \pm 3,71\%$). In absoluten Zahlen zeigten sich nur diskrete Verminderungen des B-Zellgehalts in den Versuchsgruppen im Vergleich zu unbehandelten Spendern und Empfängern (DT: $0,24 \pm 0,07 \times 10^6$, PBS: $0,10 \pm 0,02 \times 10^6$, Spender: $0,32 \pm 0,07 \times 10^6$, Empfänger: $0,50 \pm 0,09 \times 10^6$).

Granulozyten waren in der DT-Gruppe allenfalls leicht gegenüber der PBS-Gruppe erhöht (DT: $0,45 \pm 0,07 \times 10^6$, PBS: $0,39 \pm 0,10 \times 10^6$) und ihr prozentualer Anteil unter allen Leukozyten unterschied sich nicht signifikant in beiden Gruppen. In unbehandelten Tieren waren Granulozyten dagegen kaum nachweisbar (Spender: $0,45 \pm 0,01\%$ entsprechend $0,007 \pm 0,003 \times 10^6$, Empfänger: $0,33 \pm 0,05\%$ entsprechend $0,008 \pm 0,003 \times 10^6$).

Der prozentuale Beitrag von Monozyten an allen isolierten Leukozyten war vergleichbar. Ihre tatsächliche Anzahl war in den in der PBS-Gruppe und im Besonderen in der DT-Gruppe im Vergleich zu unbehandelten Tieren erhöht. Der Unterschied zwischen der DT-Gruppe und unbehandelten Empfänger erreichte Signifikanz (DT: $16,4 \pm 2,44\%$ entsprechend $1,28 \pm 0,22 \times 10^6$, PBS: $17,5 \pm 2,1\%$ entsprechend $0,75 \pm 0,18 \times 10^6$, Spender: $28,5 \pm 6,65\%$ entsprechend $0,34 \pm 0,11 \times 10^6$, Empfänger: $21,9 \pm 2,98\%$ entsprechend $0,38 \pm 0,09 \times 10^6$).

Bei Analyse der Dünndarm-LPL fiel in der DT-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe eine mäßige, im Vergleich zu unbehandelten Tieren jedoch hochsignifikante Erhöhung des prozentualen Anteils von T-Zellen unter allen Leukozyten auf (DT: $62,0 \pm 4,70\%$, PBS: $51,3 \pm 3,75\%$, Spender: $28,9 \pm 1,62\%$, Empfänger: $32,0 \pm 1,64\%$). In absoluten Zahlen ausgedrückt war die durchschnittliche Ausbeute an T-Zellen in der DT-Gruppe mindestens doppelt so hoch wie in den anderen Gruppen, wobei durch die starke Streuung der Einzelwerte keine Signifikanz gefunden wurde (DT: $11,2 \pm 2,52 \times 10^6$, PBS: $5,96 \pm 1,64 \times 10^6$, Spender: $1,14 \pm 0,37 \times 10^6$, Empfänger: $5,21 \pm 1,10 \times 10^6$).

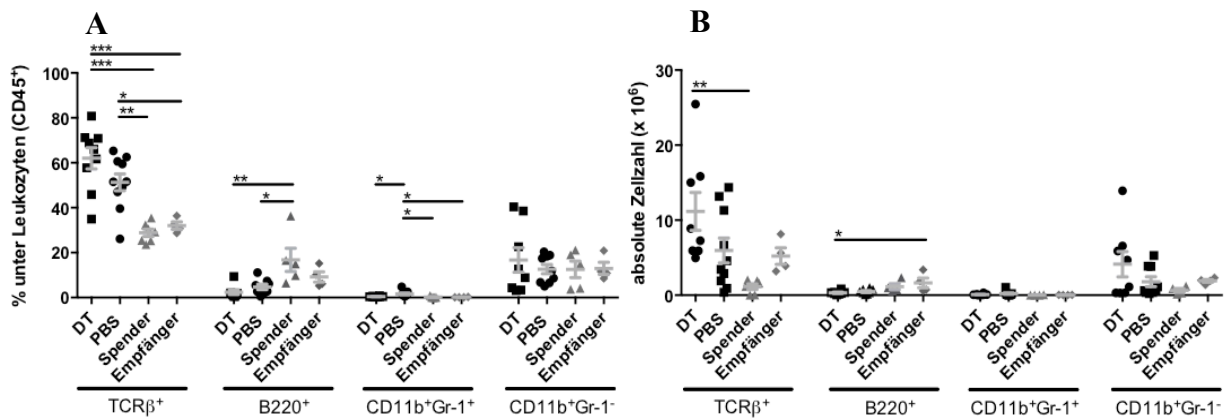


Abb. 31: Leukozytäre Zusammensetzung der Lamina Propria des Dünndarms

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n = 8-9$) oder PBS (schwarze Kreise, $n = 9-10$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=4-7$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der Versuchsgruppen entsprechen Einzelwerten. Daten unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Es fiel eine Verschiebung innerhalb des T-Zellkompartiments auf. In der DT-Gruppe detektierten wir ein signifikantes Auswachsen von DN⁺ T-Zellen gegenüber der PBS-Gruppe. Sowohl ihr Anteil an T-Zellen, als auch ihre tatsächliche Anzahl stieg durch Verabreichung von DT. Auch gegenüber unbehandelten Spendern fielen in der DT-Gruppe signifikant erhöhte Zellmengen auf (DT: $48,7 \pm 4,92\%$ entsprechend $6,08 \pm 1,76 \times 10^6$, PBS: $26,2 \pm 1,55\%$ entsprechend $1,63 \pm 0,46 \times 10^6$, Spender: $1,87 \pm 0,21 \times 10^6$).

Die prozentualen Anteile von CD4⁺ Tconv unterschieden sich im Vergleich der Gruppen nicht signifikant und rangierten zwischen $49,1 \pm 4,51\%$ und $54,6 \pm 1,26\%$. Absolut waren in der DT-Gruppe die größten Mengen nachweisbar, wobei nur der Vergleich zu unbehandelten Spendern Signifikanz erreichte (DT: $4,9 \pm 0,85 \times 10^6$, PBS: $3,28 \pm 0,92 \times 10^6$, Spender: $0,65 \pm 0,23 \times 10^6$, Empfänger $2,79 \pm 0,75 \times 10^6$).

Treg waren in der DT-Gruppe am Tag der Analyse maximal supprimiert. Ihr Anteil an allen T-Zellen lag hochsignifikant unter der PBS-Gruppe, welche ihrerseits etwa doppelt so hohe Werte wie unbehandelte Kontrollen aufwies (DT: $0,79 \pm 0,17\%$, PBS: $18,1 \pm 1,58\%$, Spender $7,80 \pm 1,86\%$, Empfänger: $9,89 \pm 0,61\%$).

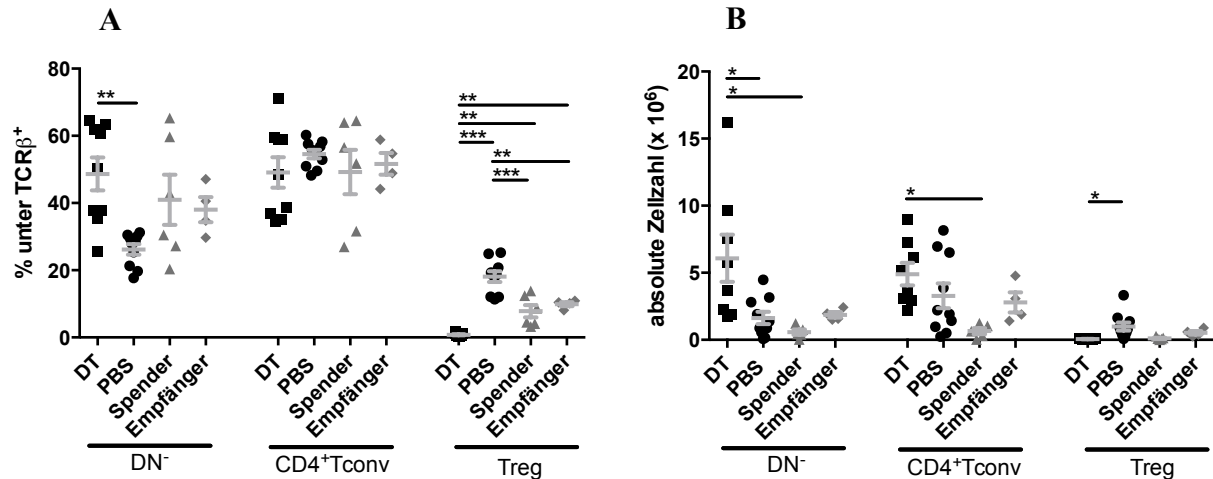


Abb. 32: Subklassifizierung der Lamina Propria-ständigen T-Zellen des Dünndarms

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n = 8-9$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=10$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter T-Zellen (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=5-6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der Versuchsgruppen entsprechen Einzelwerten. Daten unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Ki-67 Färbungen belegten auch in Dünndärmen der DT-Gruppe eine ausgeprägte Proliferationsaktivität der darstellbaren T-Zell-Subsets. In der DT-Gruppe waren $46,03 \pm 5,02\%$ der TCRβ⁺CD4⁻ Lymphozyten – entsprechend DN⁻ T-Zellen – positiv für Ki-67, während in der PBS-Gruppe und unbehandelten Tieren TCRβ⁺CD4⁻ Zellen signifikant niedrigere Teilungsraten zeigten (PBS: $22,2 \pm 3,04\%$, Spender: $16,8 \pm 4,19\%$, Empfänger: $9,9 \pm 2,2\%$).

Gleiches trifft auf die Analyse von CD4⁺ Tconv zu. Hier konnte Ki-67 in der DT-Gruppe in $36,3 \pm 2,04\%$ der Zellen nachgewiesen werden. In der PBS-Gruppe fanden sich im Mittel $21,8 \pm 1,46\%$, in unbehandelten Spendern $18,7 \pm 3,28\%$ und in Empfängern $15,4 \pm 2,9\%$. Die Unterschiede zeigten höchste statistische Signifikanz.

Teilungsraten von $35,1 \pm 3,63\%$ im verminderten Treg-Kompartiment der DT-Gruppe lagen etwa 10% über den Vergleichswerten der anderen Gruppen, erreichten aber keine statistische Signifikanz.

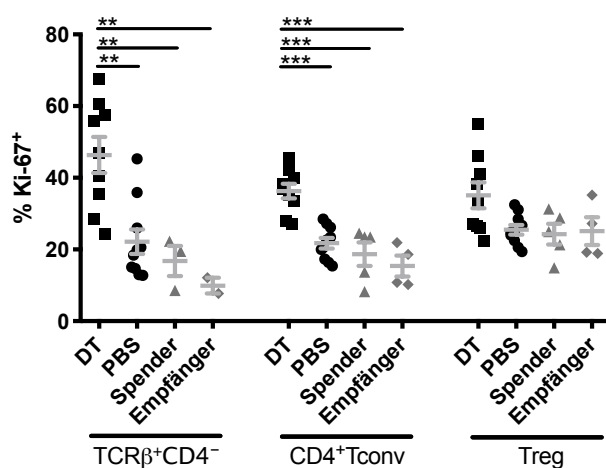


Abb. 33: Untersuchung des Teilungsverhaltens Lamina Propria-ständiger T-Zellen des Dünndarms

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=9$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=10$). Dargestellt ist der prozentuale Anteil proliferierender Lymphozyten, gemessen anhand der Expression des Teilungsmarkers Ki-67, zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=3-5$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=2-4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs.

Datenpunkte entsprechen in den Versuchsgruppen Einzelwerten. Werte für unbehandelte Tiere wurden aus Zellpools ($2 \leq n \leq 6$) gemittelt. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Wie in anderen Organen zeigt sich auch in LPL eine Verminderung der B-Zellen nach KMT, aggraviert in DT-behandelten Tieren. Die physiologischen Werte in unbehandelten Tieren beliefen sich auf das 2 bis 5-fache und der Vergleich zwischen der DT-Gruppe und unbehandelten Spendern zeigte statistische Signifikanz (DT: $2,73 \pm 1,03\%$ entsprechend $0,32 \pm 0,08 \times 10^6$, PBS: $4,74 \pm 1,22\%$ entsprechend $0,50 \pm 0,12 \times 10^6$, Spender: $16,5 \pm 5,18\%$ entsprechend $1,14 \pm 0,41 \times 10^6$, Empfänger: $9,18 \pm 2,26\%$ entsprechend $1,64 \pm 0,65 \times 10^6$).

Wir fanden generell nur geringe Mengen an Granulozyten. Der prozentuale Anteil lag interessanterweise in der PBS-Gruppe signifikant über entsprechenden Werten der DT-Gruppe und unbehandelten Kontrollen. Auf absolute Zellzahlen berechnet hielten die gefunden Unterschiede jedoch keiner Signifikanztestung stand und es bleibt fraglich, ob die gefundenen Unterschiede biologisch relevant sind (DT: $0,44 \pm 0,07\%$ entsprechend $0,09 \pm 0,03 \times 10^6$, PBS: $1,63 \pm 0,44\%$ entsprechend $0,21 \pm 0,11 \times 10^6$, Spender: $0,22 \pm 0,16\%$ entsprechend $0,02 \pm 0,01 \times 10^6$, Empfänger: $0,17 \pm 0,05\%$ entsprechend $0,03 \pm 0,003 \times 10^6$).

Der Anteil an Monozyten lag konstant zwischen $12,6 \pm 3,67$ (Spender) und $16,7 \pm 5,45\%$ (DT-Gruppe). In absoluten Zahlen übertrafen die gemittelten Werte der DT-Gruppe die der anderen Gruppen, jedoch stellte sich aufgrund der großen Streuung keine Signifikanz ein.

Zusammenfassend zeigte sich bei analogen Verschiebungen im Kompartiment der LPL des Dick- und Dünndarms eine Expansion alloreaktiver Tconv in DT-behandelten Tieren. Anders als in den bereits beschriebenen extraintestinalen Geweben (Milz, KM und LK) zeigten sich in beiden Versuchsgruppen geringere B-Zellgehalte, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen DT-behandelten und PBS-behandelten Mäusen bestand.

3.6.1.2.3 Intraepitheliale Lymphozyten

Im Dickdarm setzte sich der Pool der IEL in den Versuchsgruppen fast vollständig aus $\text{TCR}\beta^+$ T-Zellen zusammen. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und den beiden unbehandelten Kontrollen fielen hochsignifikant aus (DT: $84,7 \pm 1,57\%$, PBS: $78,7 \pm 1,51\%$, Spender: $53,3 \pm 3,02\%$, Empfänger: $51,6 \pm 2,29\%$). Auf absolute Zellzahlen berechnet ergaben sich hochsignifikant erhöhte T-Zellmengen in der DT-Gruppe, die die Werte aller anderen Gruppen circa um den Faktor 9 übertrafen (DT: $4,81 \pm 0,67 \times 10^6$, PBS: $0,68 \pm 0,28 \times 10^6$, Spender: $0,53 \pm 0,17 \times 10^6$, Empfänger: $0,53 \pm 0,12 \times 10^6$).

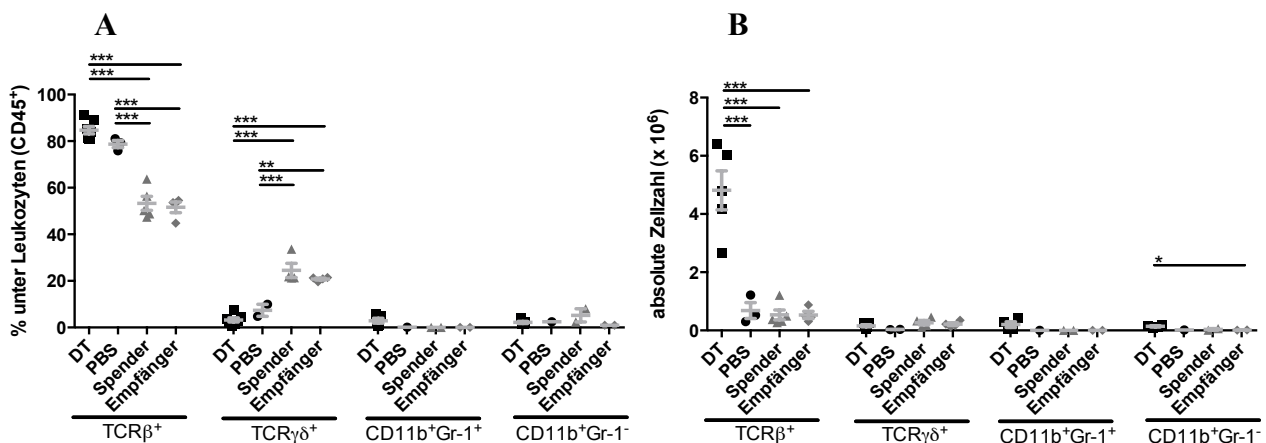


Abb. 34: Leukozytäre Zusammensetzung des Dickdarmepithels

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=4-7$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=1-3$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=2-5$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=2-4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der DT-Gruppe entsprechen Einzelwerten. Daten der PBS-Gruppe und unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

CD8⁺ Lymphozyten stellten in den Versuchsgruppen und unbehandelten Spendern vergleichbar große Anteile des TCRβ⁺ Kompartiments (DT: 72,0 ± 2,54%, PBS: 61,7 ± 7,62%, Spender: 59,9 ± 2,91%). Nur zwischen der DT-Gruppe und unbehandelten Empfängern bestanden signifikante Unterschiede (Empfänger: 50,0 ± 3,27%). Dadurch waren die tatsächlich vorhandenen Populationen an CD8⁺ T-Zellen in der DT-Gruppe hochsignifikant gegenüber allen anderen Gruppen erhöht (DT: 3,46 ± 0,47 x10⁶, PBS: 0,38 ± 0,10 x10⁶, Spender: 0,34 ± 0,11 x10⁶, Empfänger: 0,27 ± 0,07 x10⁶).

Die Komposition CD8⁺ Lymphozyten zeigte auffällige Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen und unbehandelten Tieren. Während in den transplantierten Tieren nur noch einstellige Prozentanteile auf den mit regulatorischen Funktionen assoziierten CD8αα⁺-Subtyp entfielen, machte dieser in beiden Kontrollen die überwältigende Mehrheit aller CD8⁺ Lymphozyten aus (DT: 3,9 ± 0,67%, PBS: 5,9 ± 2,4%, Spender: 83,4 ± 4,65%, Empfänger: 82,6 ± 1,97%, Daten nicht gezeigt).

DN⁺ Lymphozyten waren unter TCRβ⁺ Zellen in beiden Versuchsgruppen im Vergleich zu unbehandelten Spendern und Empfängern hochsignifikant unterrepräsentiert und ihre prozentualen Anteile unterschieden sich nur geringfügig voneinander (DT: 0,60 ± 0,11%, PBS: 3,07 ± 1,27%, Spender: 29,03 ± 3,07%, Empfänger 20,2 ± 2,18%). Der stammspezifische Unterschied zwischen unbehandelten Spendern und Empfängern war ebenfalls signifikant. Die absoluten Zellzahlen von DN⁺ Lymphozyten zeigten in den beiden experimentellen Gruppen spärlichere Populationen als die beiden unbehandelten Gruppen, welche etwa 4-mal mehr Zellen dieses Subtyps aufwiesen. Der Vergleich zwischen DT-Tieren und unbehandelten Spendern erreichte Signifikanz (DT: 0,03 ± 0,01 x10⁶, PBS: 0,03 ± 0,02 x10⁶, Spender: 0,14 ± 0,03 x10⁶, Empfänger: 0,10 ± 0,02 x10⁶).

CD4⁺ Tconv waren in den Versuchsgruppen und unbehandelten Empfängern in ähnlich großen Fraktionen vertreten, zeigten aber gegenüber unbehandelten Spendern signifikant erhöhte Anteile (DT: 27,0 ± 2,51%, PBS: 32,8 ± 6,86%, Spender: 6,72 ± 1,43%, Empfänger: 25,8 ± 1,05 %). CD4⁺ Tconv waren in der DT-Gruppe somit in 5 bis 32-fachen Mengen im Vergleich zu den anderen Gruppen nachweisbar. Die Unterschiede waren hochsignifikant (DT: 1,3 ± 0,25 x10⁶, PBS: 0,26 ± 0,15 x10⁶, Spender: 0,04 ± 0,02 x10⁶, Empfänger: 0,14 ± 0,03 x10⁶).

Treg machen mit Maximalwerten von 3,59 ± 0,43% in unbehandelten Empfängern in allen Gruppen nur einen kleinen Anteil der intraepithelialen T-Zellen aus. Durch die Gabe von DT verschwand aber auch diese Fraktion. Mit prozentualen Werten von 2,14 ± 0,33% in der PBS-

Gruppe und $0,84 \pm 0,28\%$ in unbehandelten Spendern trugen Treg in der DT-Gruppe mit nur $0,13 \pm 0,02\%$ praktisch nicht mehr zum Aufbau des T-Zellkompartiments bei. In absoluten Zellzahlen bemessen ergaben sich kaum detektierbare Werte (DT: $0,006 \pm 0,002 \times 10^6$, PBS: $0,01 \pm 0,003 \times 10^6$, Spender: $0,005 \pm 0,003 \times 10^6$, Empfänger: $0,02 \pm 0,005 \times 10^6$).

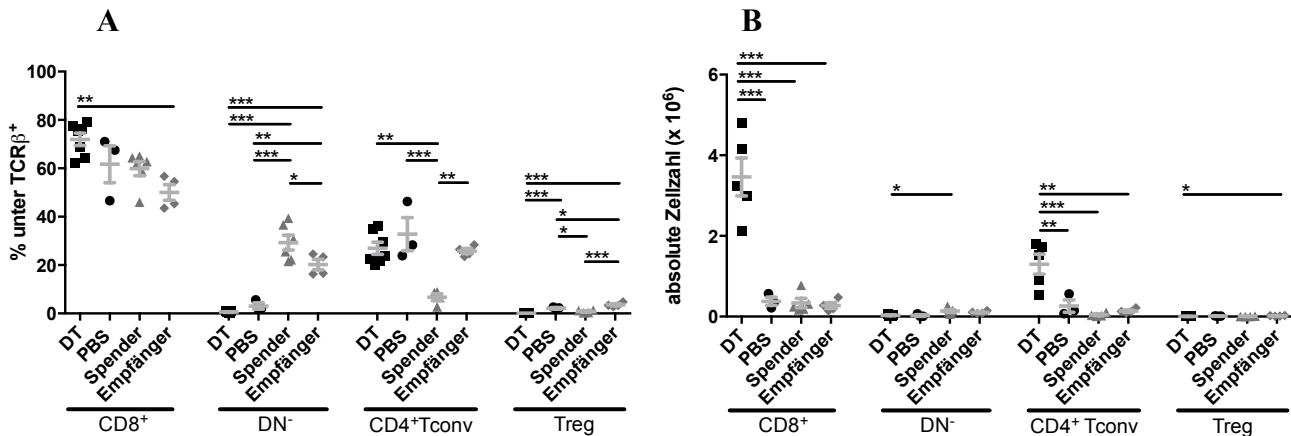


Abb. 35: Subklassifizierung der intraepithelialen TCRβ⁺ Lymphozyten des Dickdarms

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=5-7$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=3$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter TCRβ⁺ Lymphozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=4-6$) und Empfänger (graue Rhoenben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der DT-Gruppe entsprechen Einzelwerten. Daten der PBS-Gruppe und unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens zeigte für die DT-Gruppe ungewöhnlich große Anteile sich teilender Zellen mit der Oberflächensignatur TCRβ⁺CD4⁻. Da in den experimentellen Gruppen kaum DN⁻ Zellen nachweisbar sind, handelt es sich in der PBS-Gruppe hierbei um CD8⁺ konventionelle T-Zellen. In unbehandelten Tieren wurden im Kompartiment der IEL auch, wie oben ausgeführt, DN⁻ T-Zellen angetroffen, welche ebenfalls durch die Gatingstrategie abgebildet werden. In jedem Fall besitzen beide Linien die Immunkompetenz differenzierter T-Zellen und haben alloaggressives Potential. Die Unterschiede waren zwischen der DT-Gruppe und der PBS-Gruppe bzw. unbehandelten Spendern hochsignifikant (DT: $44,6 \pm 2,94\%$, PBS $15,6 \pm 1,27\%$, Spender: $13 \pm 2,46\%$, Empfänger: $32,6 \pm 8,15\%$).

Des Weiteren konnten wir für $CD4^+$ Tconv der DT-Gruppe eine hochsignifikant erhöhte Proportion sich teilender Zellen belegen. Wir fanden mit $49,7 \pm 4,71\%$ eine 3 bis 6-fach größere Fraktion Ki-67⁺ T-Zellen als in den Vergleichsgruppen (PBS: $18,2 \pm 4,48\%$, Spender: $15,4 \pm 2,8\%$, Empfänger: $8,53 \pm 3,63\%$).

Die Gabe von DT bewirkte auch unter den noch in marginalen Mengen vorhandenen Treg eine erhöhte Proliferationsrate. Die Unterschiede gegenüber anderen Gruppen waren deutlich und verfehlten nur knapp die Signifikanz (DT: $50,1 \pm 4,58\%$, PBS: $27,7 \pm 7,74\%$, Spender: $35,7 \pm 3,41\%$, Empfänger: $31,9 \pm 3,7\%$).

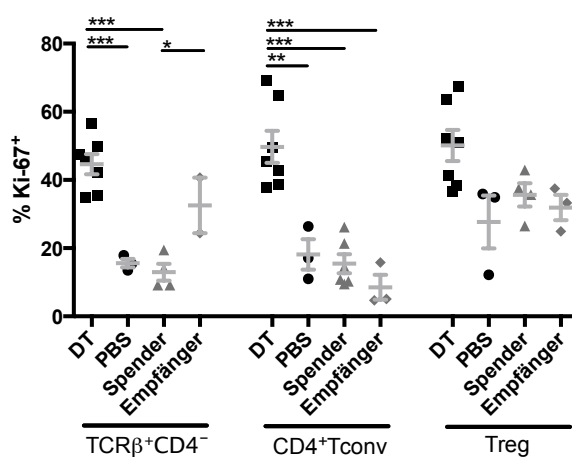


Abb. 36: Untersuchung des Teilungsverhaltens intraepithelialer TCRβ⁺ Zellen des Dickdarms

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=7$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=3$). Dargestellt ist der prozentuale Anteil proliferierender Lymphozyten, gemessen anhand der Expression des Teilungsmarkers Ki-67, zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=4$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=2-3$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der DT-Gruppe entsprechen Einzelwerten. Daten der PBS-Gruppe und unbehandelten Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

SEM. Datenpunkte der DT-Gruppe entsprechen Einzelwerten. Daten der PBS-Gruppe und unbehandelten Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

$3,24 \pm 0,86\%$ aller reisolierten Leukozyten entfielen in der DT-Gruppe auf TCRγδ⁺ Lymphozyten. Dieser Wert entspricht ca. 50% des Anteils in der PBS-Gruppe ($7,39 \pm 2,6\%$). Aufgrund der Notwendigkeit, Zellen der PBS-Gruppe zu poolen und der damit einhergehenden geringen Anzahl von Einzelwerten erreichte dieser Vergleich jedoch keine Signifikanz. Demgegenüber bilden TCRγδ⁺ Zellen in unbehandelten Tieren stattliche Fraktionen am Leukozytenbestand. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und den Kontrollen waren jeweils hochsignifikant (Spender: $24,5 \pm 3,03\%$, Empfänger: $20,8 \pm 0,42\%$). Die prozentualen Auffälligkeiten fanden keine Entsprechung in absoluten Zellzahlen. Es scheinen Unterschiede im Gehalt von Granulozyten zwischen den Gruppen zu existieren, wegen sehr geringer Zellausbeuten an IEL in der PBS-Gruppe konnte die Färbung des myeloischen Kompartiments allerdings nur in einfacher Ausführung mit vereinigten Zellen durchgeführt werden. Eine Signifikanztestung war deshalb nicht möglich und weitere

Experimente müssen zur Festigung des ersten Eindrucks durchgeführt werden. Während Granulozyten in der PBS-Gruppe und in unbehandelten Kontrollen faktisch nicht nachweisbar waren, machten sie in der DT-Gruppe mit $2,91 \pm 1,05\%$ entsprechend $0,2 \pm 0,09 \times 10^6$ Zellen eine detektierbare Leukozytenklasse aus.

Der Vergleich der Monozyten zeigte keine ausgeprägten prozentualen Abweichungen. Ihr Anteil unter allen isolierten Leukozyten bewegt sich zwischen $0,96 \pm 0,005\%$ in unbehandelten Empfängern und $5,21 \pm 2,82\%$ in unbehandelten Spendern. In absoluten Zellzahlen findet man mehr Monozyten in der DT-Gruppe ($0,14 \pm 0,02 \times 10^6$) als in der PBS-Gruppe ($0,02 \times 10^6$, Poolwert, $n=4$), unbehandelten Spendern ($0,04 \pm 0,03 \times 10^6$) und unbehandelten Empfängern ($0,01 \pm 0,003 \times 10^6$). Eine Signifikanztestung ist aufgrund des Einzelwertes in der PBS-Gruppe nicht sinnvoll.

In den untersuchten Dünndarmepithelien entsprachen sich in etwa die prozentualen Anteile von $\text{TCR}\beta^+$ Zellen in den beiden Versuchsgruppen und unbehandelten Empfängern. Unbehandelte Spender weisen signifikant geringere Proportionen dieser Zellart auf (DT: $80,3 \pm 3,57\%$, PBS: $71,5 \pm 2,49\%$, Empfänger: $68,1 \pm 1,4\%$, Spender: $34,8 \pm 1,84\%$). In absoluten Zellzahlen bemessen fanden wir hochsignifikant erhöhte Mengen an $\text{TCR}\beta^+$ Zellen in der DT-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe und unbehandelten Tieren (DT: $26,8 \pm 4,16 \times 10^6$, PBS: $9,95 \pm 2,04 \times 10^6$, Spender: $5,8 \pm 1,41 \times 10^6$, Empfänger: $11,3 \pm 1,39 \times 10^6$).

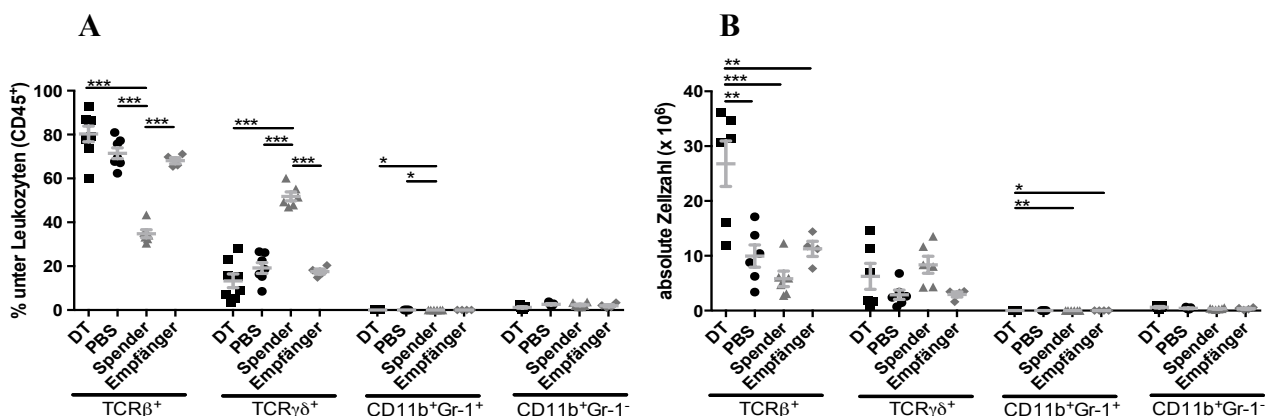


Abb. 37: Leukozytäre Zusammensetzung des Dünndarmepithels

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=5-8$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=5-7$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der Versuchstiere entsprechen Einzelwerten. Daten unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die

statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt ($p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).*

Die Analyse der $\text{TCR}\beta^+$ Zellkomposition zeigte hochsignifikant erhöhte Anteile CD8^+ Lymphozyten in der DT-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe. Jedoch wiesen auch unbehandelte Tiere gegenüber der PBS-Gruppe erhöhte Werte dieses Subtyps auf (DT: $77,6 \pm 2,61\%$, PBS: $62,2 \pm 1,29\%$, Spender: $73,7 \pm 2,71\%$, Empfänger: $70,2 \pm 2,11\%$). Auf Ebene der absoluten Zellzahlen fanden wir in der DT-Gruppe hochsignifikant erhöhte Mengen an CD8^+ T-Zellen im Vergleich zu allen anderen Gruppen (DT: $21,6 \pm 3,5 \times 10^6$, PBS: $6,12 \pm 1,24 \times 10^6$, Spender: $4,11 \pm 0,85 \times 10^6$, Empfänger: $7,88 \pm 0,91 \times 10^6$).

In Analogie der Befunde des intraepithelialen Kompartiments im Dickdarm zeigten CD8^+ Lymphozyten in den Versuchsgruppen nur eine spärliche Zugehörigkeit zum $\text{CD8}\alpha\alpha^+$ -Subset, während sich in unmanipulierten Tieren mindestens die Hälfte aller CD8^+ Zellen dieser Linie zuordnen ließen (DT: $4,88 \pm 0,86\%$, PBS: $6,62 \pm 0,68\%$, Spender: $54,43 \pm 4,3\%$, Empfänger: $60,23 \pm 2,72\%$).

Die prozentualen Anteile und auch die tatsächlichen Zellzahlen von DN^- Zellen sind in den Versuchsgruppen nur klein und unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Unbehandelte Tiere weisen sowohl größere prozentuale Anteile als auch absolute Mengen von DN^- Lymphozyten auf, wobei Vergleiche mit unbehandelten Empfängern hohe Signifikanz erreichten (DT: $0,5 \pm 0,1\%$ entsprechend $0,13 \pm 0,05 \times 10^6$, PBS: $1,83 \pm 0,4\%$ entsprechend $0,17 \pm 0,04 \times 10^6$, Spender: $4,0 \pm 0,55\%$ entsprechend $0,20 \pm 0,02 \times 10^6$, Empfänger: $8,40 \pm 1,3\%$ entsprechend $0,90 \pm 0,06 \times 10^6$).

Die prozentualen Anteile von CD4^+ Tconv verschieben sich bei der Betrachtung der beiden experimentellen Gruppen interessanterweise in der PBS-Gruppe zu signifikant höheren Werten (DT: $21,0 \pm 2,68\%$, PBS: $32,6 \pm 1,67\%$). Gegenüber unbehandelten Empfängern wiesen beide experimentelle Gruppen signifikant erhöhte Anteile auf. Im Bezug zu unbehandelten Spendern fanden sich signifikante Unterschiede nur im Vergleich zur PBS-Gruppe (Spender: $16,5 \pm 2,16\%$, Empfänger: $5,90 \pm 0,88\%$). Legt man die gefundenen Zellausbeuten zugrunde, zeigen Tiere der DT-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe nur subtile Erhöhungen, gegenüber unbehandelten Tieren jedoch eine deutlich größere Population von CD4^+ Tconv (DT: $4,77 \pm 0,71 \times 10^6$, PBS: $3,37 \pm 0,81 \times 10^6$, Spender: $1,03 \pm 0,29 \times 10^6$, Empfänger: $0,68 \pm 0,17 \times 10^6$).

Treg waren erwartungsgemäß in der DT-Gruppe am Tag der Analyse maximal supprimiert. Demgegenüber detektierten wir in Tieren der PBS-Gruppe ein signifikant größeres prozentuales und absolutes Treg-Kompartiment als in den anderen Gruppen (DT: $0,08 \pm 0,01\%$ entsprechend $0,02 \pm 0,004 \times 10^6$, PBS: $3,06 \pm 0,42\%$ entsprechend $0,28 \pm 0,05 \times 10^6$, Spender: $1,13 \pm 0,18\%$ entsprechend $0,06 \pm 0,01 \times 10^6$, Empfänger: $0,24 \pm 0,07\%$ entsprechend $0,03 \pm 0,01 \times 10^6$).

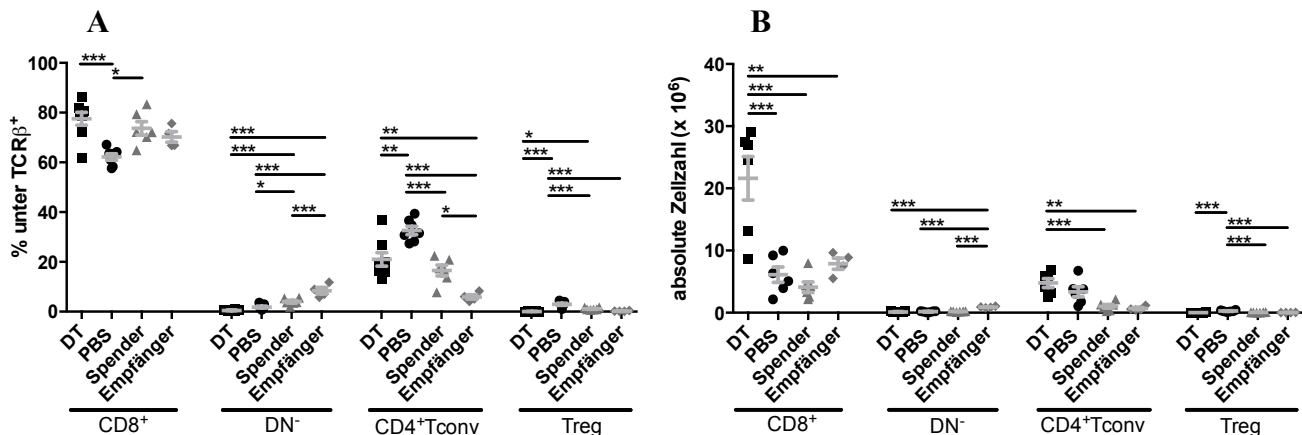


Abb. 38: Subklassifizierung der intraepithelialen TCRβ⁺ Lymphozyten des Dünndarms

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=6-8$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=6-7$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter TCRβ⁺ T-Lymphozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der Versuchstiere entsprechen Einzelwerten. Daten unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 zeigte eine signifikant erhöhte Quote sich teilender TCRβ⁺CD4⁺ Lymphozyten in der DT-Gruppe gegenüber Tieren der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern an. Zu unbehandelten Empfängern liegen nicht genügend Daten für statistische Berechnungen vor. In einer ersten Untersuchung (Poolwert, $n=6$) liegen aber auch diese Tiere deutlich hinter der DT-Gruppe (DT: $42,3 \pm 3,33\%$, PBS: $18,5 \pm 2,3\%$, Spender: $19,9 \pm 3,49\%$, Empfänger: $5,19\%$).

Auch CD4⁺ Tconv zeigten in der DT-Gruppe erhöhte Teilungsaktivität. Die bestimmten Werte lagen mit $49 \pm 2,34\%$ hochsignifikant über ihren Entsprechungen in den anderen Gruppen (PBS: $18,9 \pm 1,67\%$, Spender: $34,5 \pm 2,59\%$, Empfänger: $19,0 \pm 4,05\%$).

Weiterhin fanden wir bei der Analyse des Teilungsverhaltens der stark dezimierten Treg in der DT-Gruppe erhöhte Fraktionen Ki-67⁺ Zellen. Die gefunden Werte unterschieden sich hochsignifikant von denen der PBS-Gruppe und unbehandelten Empfängern. Lediglich unbehandelte Spender wiesen vergleichbare große Anteile mitotisch aktiver Treg auf (DT: $57,5 \pm 3,65\%$, PBS: $33,3 \pm 1,61\%$, Spender: $54,6 \pm 5,74\%$, Empfänger: $39,2 \pm 4,55\%$).

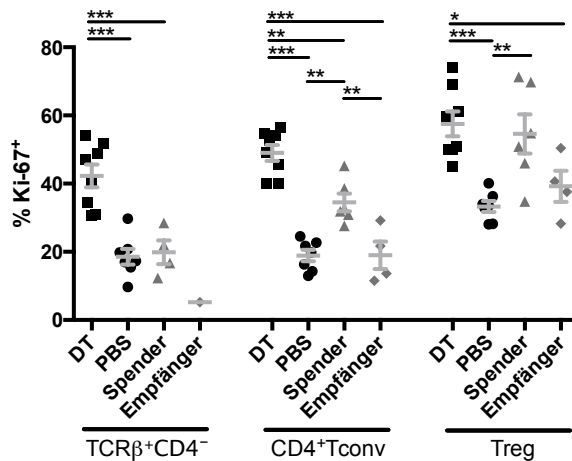


Abb. 39: Untersuchung des Teilungsverhaltens intraepithelialer TCRβ⁺ T-Zellen des Dünndarms

Versuchstiere erhielten an d26, 28 und 30 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=8$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=7$). Dargestellt ist der prozentuale Anteil proliferierender Lymphozyten, gemessen anhand der Expression des Teilungsmarkers Ki-67 zum Analysezeitpunkt um d40 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=4-6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=1-4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der Versuchstiere entsprechen Einzelwerten. Daten unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

SEMs. Datenpunkte der Versuchstiere entsprechen Einzelwerten. Daten unbehandelter Tiere sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Wir beobachteten in den Versuchsgruppen und im Besonderen in der DT-Gruppe eine Reduktion im Anteil von TCRγδ⁺ T-Zellen gegenüber unbehandelten Spendern, die wiederum gegenüber unbehandelten Empfängern auffällige hohe stammspezifische Proportionen zeigten. Die prozentualen Unterschiede erreichten höchste Signifikanz, konnten aber nicht in absoluten Zahlen reproduziert werden (DT: $13,3 \pm 3,16\%$, PBS: $19,2 \pm 2,45\%$, Spender: $51,8 \pm 2,05\%$, Empfänger: $17,6 \pm 1,17\%$).

Granulozyten und Monozyten sind in den Gruppen nahezu nicht vertreten und ihr prozentualer Beitrag zur Bildung des Leukozytenpools zeigt keine bemerkenswerten Unterschiede.

3.6.1.2.4 Zusammenfassung

Die durchflusszytometrische Analyse belegte in den untersuchten intestinalen Geweben Treg-depletierter Tiere das Bild einer dramatischen Immundysregulation auf zellulärer Ebene. Tiere der DT-Gruppe zeigten vor allem gegenüber unbehandelten Kontrollen, aber auch gegenüber Mäusen der PBS-Gruppe einen massiven Influx von Entzündungszellen, wobei die

Effekte im Dickdarm am ausgeprägtesten waren. Die Anfärbung der wichtigsten Leukozytenklassen stellte $\text{TCR}\beta^+$ T-Zellen als vorherrschende Zelllinie in allen Kompartimenten heraus. Durch eine $\text{TCR}\beta^+$ -Subtyp-Analyse konnten infiltrierende T-Zellen weiter differenziert werden: in der Lamina Propria ließ sich der Einstrom auf DN^- Lymphozyten und CD4^+ Tconv zurückführen, im einschichtigen Deckepithel von Dick- und Dünndarm imponierten vergrößerte Populationen von CD8^+ T-Zellen und CD4^+ Tconv. Die im zugrundeliegenden murinen Modell pathophysiologisch hochrelevanten CD4^+ Tconv zeigten in allen untersuchten Kompartimenten eine stark erhöhte Teilungsaktivität, aber auch für DN^- Lymphozyten und CD8^+ T-Zellen – beides Effektor-T-Zelllinien mit alloaggressivem Potential – waren erhöhte Proliferationsraten nachweisbar. Die nach DT-Gabe stark unterrepräsentierten Treg schienen im Sinne einer Gegenregulation überdurchschnittlich stark zu proliferieren, jedoch erreichte dieser Effekt nur im epithelialen Kompartiment des Dünndarms Signifikanz.

Außerhalb des T-Zellpools zeigten sich in der Lamina Propria stark unterrepräsentierte B-Zellpopulationen in beiden experimentellen Gruppen, wohingegen diese als Vertreter der humoralen Abwehr in unbehandelten Tieren einen integralen Bestandteil residenter Immunzellen darstellten. Im Epithel stellten die eher mit immunmodulatorischen Aufgaben assoziierten $\text{TCR}\gamma\delta^+$ T-Zellen nur eine geringe Fraktion in transplantierten Tieren. Gleichzeitig zeigten proinflammatorische Granulozyten hauptsächlich im Dickdarm transplanteder Tiere eine präferentielle Einwanderung mit erhöhten prozentualen und absoluten Anteilen.

3.6.2 Kurzzeit

3.6.2.1 Analyse extraintestinaler Organe

3.6.2.1.1 Vorbemerkungen und Zellzahlen

Im Rahmen der frühen Elimination von Treg wurden nach denselben Kriterien wie für die späte Treg-Depletion durchflusszytometrische Färbungen zur Charakterisierung bedeutsamer Immunkompartimente durchgeführt (vgl. Kapitel 3.6.1.1.1 Vorbemerkungen und Zellzahlen). Extrahierte Zellen aus der Milz, dem Knochenmark und der Lymphknoten von PBS-Tieren wiesen zum Zeitpunkt der Analyse (d19/20 nach alloKMT) mit einer H-2K^b-Expression von wenigstens $95,98 \pm 2,55\%$ (B-Zellen der Lymphknoten) einen nahezu vollständigen Spenderchimärismus auf.

In der DT-Gruppe zeigten Werte von $92,56 \pm 3,46 \%$ (B-Zellen der Milz) und $72,12 \pm 6,31\%$ (B-Zellen der Lymphknoten) eine partielle Persistenz von empfängerstämmigen Leukozyten nach Konditionierung an. Abgesehen von diesen beiden Ausnahmen waren die im Folgenden beschriebenen Zellen zu mindestens $96,72 \pm 1,77\%$ positiv für H-2K^b.

Alle Organe der experimentellen Gruppen wiesen eine hochsignifikant verringerte Anzahl an Leukozyten gegenüber unbehandelten Spendern auf. Dabei waren die Zellzahlen von Tieren der DT-Gruppe mit denen der PBS-Gruppe vergleichbar.

In der Milz betrugen die Zellausbeuten in der DT-Gruppe im Schnitt $20,03 \pm 2,54 \times 10^6$, in der PBS-Gruppe $15,42 \pm 1,29 \times 10^6$ und von unbehandelten Spendern $104,5 \pm 13,6 \times 10^6$.

Die Zellularität lag im Knochenmark der DT-Gruppe bei $12,65 \pm 1,62 \times 10^6$, in der PBS-Gruppe bei $14,4 \pm 0,83 \times 10^6$ und unter unbehandelten Spendern bei $31,5 \pm 4,67 \times 10^6$ Leukozyten. Die Analyse der Lymphknoten ergab für DT-Tiere im Mittel $0,43 \pm 0,26 \times 10^6$, die PBS-Gruppe lag bei $0,18 \pm 0,01 \times 10^6$ und für unbehandelte Spender wurden $7,48 \pm 1,61 \times 10^6$ ausgezählt.

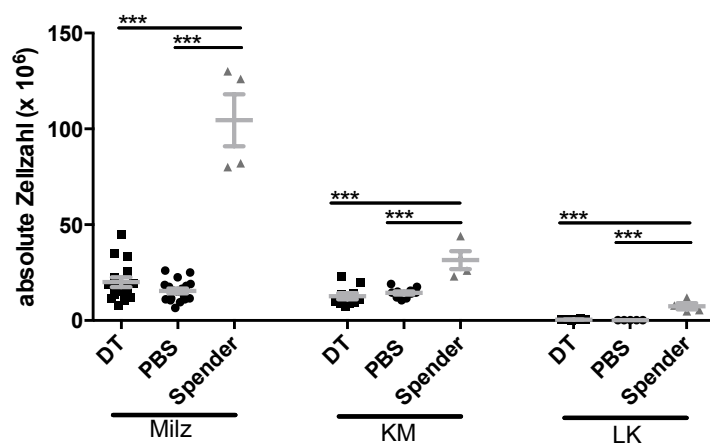


Abb. 40: Absolute Zellzahlen reisolierter Leukozyten der Milz, des Knochenmarks und gepoolter peripherer und mesenterialer Lymphknoten

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=8-16$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=4-18$). Dargestellt sind absolute Zellzahlen reisolierter Leukozyten zum Analysezeitpunkt an d19 (DT) und 20 (PBS) aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

3.6.2.1.2 Organinfiltrierende Leukozyten der Milz

In Milzen der DT-Gruppe fanden wir eine Zunahme des prozentualen Anteils von T-Zellen an allen reisolierten Leukozyten. Die DT-Gruppe lag mit $19,74 \pm 1,26\%$ deutlich über Tieren der

PBS-Gruppe, aber unter unbehandelten Spendern. Der Vergleich der Versuchsgruppen untereinander, sowie der PBS-Gruppe mit unbehandelten Spendern ergab hochsignifikante Differenzen (PBS: $9,78 \pm 0,94\%$, Spender: $29,41 \pm 1,45\%$). Auf absolute Zellzahlen bezogen detektierten wir erhöhte Werte in der DT-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe. Beide experimentellen Gruppen rangierten weit unter den Werten von unbehandelten Spendern (DT: $3,75 \pm 0,49 \times 10^6$, PBS: $1,43 \pm 0,20 \times 10^6$, Spender: $30,34 \pm 3,11 \times 10^6$).

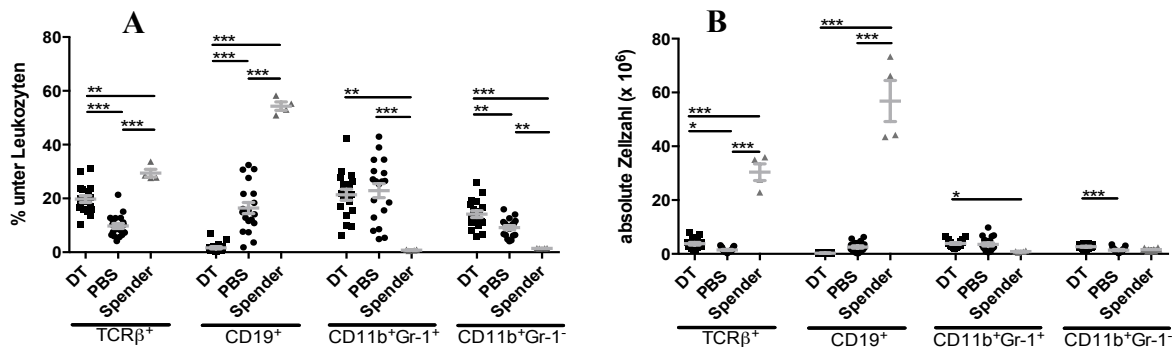


Abb. 41: Leukozytäre Zusammensetzung der Milz

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=16-18$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=19$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt an d19 (DT) und 20 (PBS) aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

CD8⁺ Lymphozyten bildeten in beiden experimentellen Gruppen, insbesondere in der DT-Gruppe, massiv erhöhte Anteile unter allen T-Zellen. Unterschiede zwischen den beiden experimentellen Gruppen waren signifikant, der Vergleich zu unbehandelten Spendern erreichte jeweils die höchste Signifikanzstufe (DT: $81,09 \pm 1,21\%$, PBS: $74,66 \pm 2,06\%$, Spender: $39,39 \pm 0,76\%$). Der Transfer auf absolute Zellzahlen zeigt eine hochsignifikante Erhöhung in der DT-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe (DT: $3,08 \pm 0,41 \times 10^6$, PBS: $1,05 \pm 0,14 \times 10^6$). Im Vergleich zu unbehandelten Spendern, die im Schnitt $12,06 \pm 1,09 \times 10^6$ CD8⁺ T-Zellen aufwiesen, zeigten die beiden experimentellen Gruppen dennoch das Bild einer tiefen Zytopenie.

Die prozentualen und absoluten Werte für CD4⁺ Tconv lagen in der DT-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe auf einem nur leicht erhöhten Niveau. Gegenüber unbehandelten Spendern waren sie in beiden Versuchsgruppen hoch signifikant verringert (DT: $13,24 \pm 1,05\%$

entsprechend $0,44 \pm 0,05 \times 10^6$, PBS: $11,68 \pm 1,20\%$ entsprechend $0,16 \pm 0,02 \times 10^6$, Spender: $49,89 \pm 0,7\%$ entsprechend $15,14 \pm 1,55 \times 10^6$).

Treg waren in der DT-Gruppe nur in geringer Frequenz und absoluter Zahl nachweisbar. Im Gegensatz zur Elimination von Treg an d26, 28 und 30 nach alloKMT zeigten Tiere der PBS-Gruppe bei der Analyse keine über die physiologische Norm erhöhten prozentualen Anteile an allen T-Zellen, sondern waren erwartungsgemäß (aufgrund der Konditionierung) gegenüber unbehandelten Spendern signifikant verringert (DT: $0,47 \pm 0,05\%$ entsprechend $0,02 \pm 0,004 \times 10^6$, PBS: $3,8 \pm 0,31\%$ entsprechend $0,05 \pm 0,007 \times 10^6$, Spender: $5,64 \pm 0,36\%$ entsprechend $1,74 \pm 0,27 \times 10^6$).

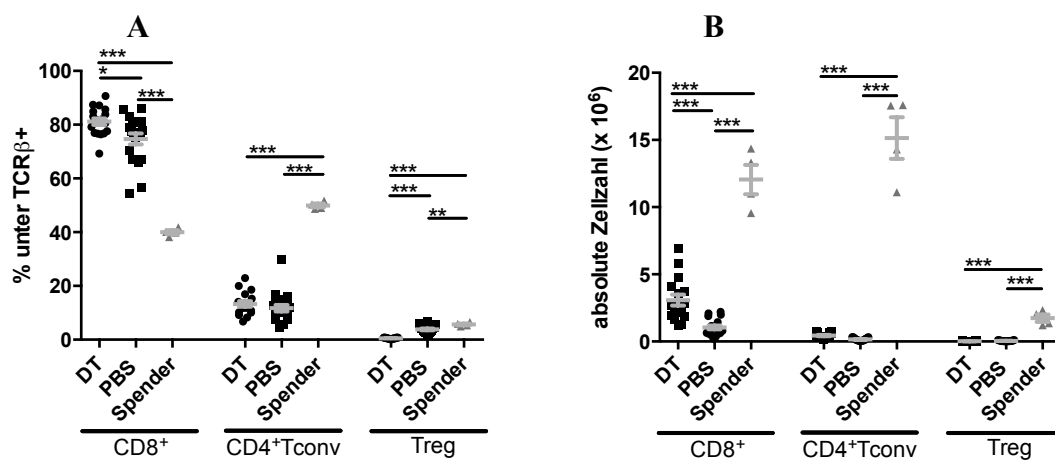


Abb. 42: T-Zell-Subpopulationen der Milz

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=16-18$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=19-20$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter T-Zellen (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt an d19 (DT) und 20 (PBS) aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Wir fanden darüber hinaus einen nahezu vollständigen Verlust an B-Zellen in der DT-Gruppe. Prozentuale Unterschiede des B-Zellgehalts waren sowohl zwischen beiden Transplantationsgruppen und unbehandelten Spendern hochsignifikant, als auch im Vergleich zwischen DT und PBS-behandelten Transplantationsempfängern (DT: $1,67 \pm 0,42\%$, PBS: $16,42 \pm 2,08\%$, Spender: $54,33 \pm 1,56\%$). Absolut waren B-Zellen in beiden experimentellen Gruppen gegenüber unbehandelten Spendern deutlich vermindert (DT: $0,23 \pm 0,04 \times 10^6$, PBS: $2,53 \pm 0,42 \times 10^6$, Spender: $56,78 \pm 7,63 \times 10^6$).

Der prozentuale Anteil an Granulozyten ähnelte sich in Milzen der experimentellen Gruppen, betrug dabei aber ein Vielfaches von unbehandelten Spendern (DT: $21,38 \pm 2,05\%$, PBS: $22,9 \pm 2,61\%$, Spender: $0,77 \pm 0,11\%$). Absolut erreichte bei insgesamt etwa 4-fach größeren Populationen in den experimentellen Gruppen der Vergleich zwischen der DT-Gruppe und unbehandelten Spendern Signifikanz (DT: $3,82 \pm 0,85 \times 10^6$, PBS: $3,52 \pm 0,61 \times 10^6$, Spender: $0,82 \pm 0,16 \times 10^6$).

Monozyten waren in der DT-Gruppe prozentual sowohl gegenüber der PBS-Gruppe, als auch gegenüber unbehandelten Spendern erhöht. Auch Unterschiede zwischen der PBS-Gruppe und den Kontrolltieren waren signifikant (DT: $14,14 \pm 1,27\%$, PBS: $9,15 \pm 0,76\%$, Spender: $1,52 \pm 0,04\%$). Auf absolute Zellzahlen bezogen konnten allerdings kaum Unterschiede zwischen der DT-Gruppe und unbehandelten Spendern festgestellt werden, statistisch signifikant waren sie jedoch im Vergleich zu Mäusen der PBS-Gruppe (DT: $2,63 \pm 0,2 \times 10^6$, PBS: $1,39 \pm 0,21 \times 10^6$, Spender: $1,53 \pm 0,19 \times 10^6$).

3.6.2.1.3 Organinfiltrierende Leukozyten im Knochenmark

Im Knochenmark fanden wir in der DT-Gruppe eine gegenüber der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern erhöhte Fraktion an T-Zellen. Der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen erreichte Signifikanz (DT: $3,47 \pm 0,54\%$, PBS: $1,78 \pm 0,26\%$, Spender: $2,62 \pm 0,34\%$). Absolut betrachtet wiesen beide experimentelle Gruppen geringere T-Zellgehalte auf als unbehandelte Kontrollen (DT: $0,39 \pm 0,05 \times 10^6$, PBS: $0,26 \pm 0,04 \times 10^6$, Spender: $0,87 \pm 0,25 \times 10^6$).

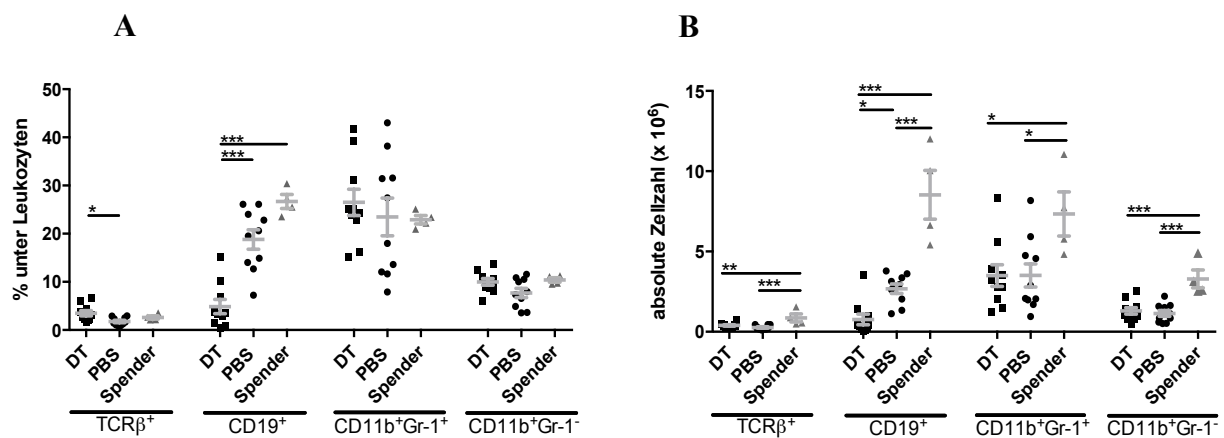


Abb. 43: Leukozytäre Zusammensetzung des Knochenmarks

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=10$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=10$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt an d19 (DT) und 20 (PBS) aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Es fiel sowohl in der DT-Gruppe, als auch in der PBS-Gruppe, ein gegenüber unbehandelten Kontrollen hochsignifikant erhöhter Anteil von $CD8^+$ T-Zellen auf (DT: $81,14 \pm 2,67\%$, PBS: $73,51 \pm 3,35\%$, Spender: $49,05 \pm 1,89\%$). Auf absolute Zellzahlen berechnet waren die Unterschiede zwischen der DT-Gruppe und unbehandelten Spendern nicht signifikant, wohl aber der Unterschiede zwischen der PBS-Gruppe und Kontrolltieren (DT: $0,31 \pm 0,03 \times 10^6$, PBS: $0,18 \pm 0,03 \times 10^6$, Spender: $0,44 \pm 0,14 \times 10^6$).

$CD4^+$ Tconv zeigten sich aufgrund der starken Dominanz von $CD8^+$ T-Zellen in den Versuchsgruppen gegenüber unbehandelten Tieren prozentual verringert. Im Vergleich zur PBS-Gruppe bestimmten wir für DT-Tiere etwa doppelt so hohe Anteile (DT: $9,22 \pm 1,64\%$, PBS: $4,26 \pm 0,63\%$, Spender: $16,30 \pm 1,55\%$). Auf absoluter Ebene imponierte eine ausgeprägte Armut an $CD4^+$ Tconv in den Versuchsgruppen im Vergleich zu unbehandelten Tieren (DT: $0,04 \pm 0,008 \times 10^6$, PBS: $0,01 \pm 0,003 \times 10^6$, Spender: $0,15 \pm 0,05 \times 10^6$).

Die Frequenz von Treg unter allen T-Zellen lag in der DT-Gruppe im Promillebereich. PBS-Tiere wiesen demgegenüber erhöhte Anteile auf, blieben aber unter den Werten unbehandelter Spender zurück. Die absoluten Zellzahlen sind auf einem organotypisch niedrigem Niveau und liegen in beiden Versuchsgruppen hochsignifikant unter den physiologischen Größen (DT: $0,17 \pm 0,03\%$ entsprechend $0,0007 \pm 0,0001 \times 10^6$, PBS: $3,44 \pm 0,3\%$ entsprechend $0,009 \pm 0,002 \times 10^6$, Spender: $11,67 \pm 0,81\%$ entsprechend $0,1 \pm 0,03 \times 10^6$).

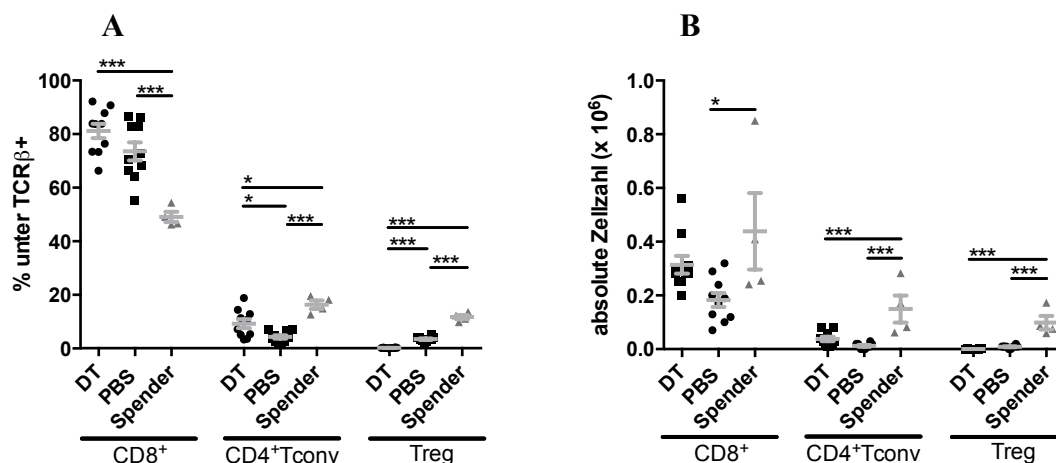


Abb. 44: T-Zell-subsets des Knochenmarks

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=10$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=10$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter T-Zellen (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt an d19 (DT) und 20 (PBS) aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt ($p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).*

Der Anteil der B-Zellen war in der DT-Gruppe hochsignifikant gegenüber Tieren der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern erniedrigt und Unterschiede zwischen PBS-Tieren und unbehandelten Spendern waren nicht mehr signifikant (DT: $4,87 \pm 1,47\%$, PBS: $18,79 \pm 2,01\%$, Spender: $26,68 \pm 1,46\%$). Die Quantifizierung ergab in der DT-Gruppe signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur PBS-Gruppe, wobei beide Versuchsgruppen eine ausgeprägte Zytopenie gegenüber unbehandelten Spendern zeigten (DT: $0,76 \pm 0,33 \times 10^6$, PBS: $2,67 \pm 0,29 \times 10^6$, Spender: $8,52 \pm 1,52 \times 10^6$).

Die prozentualen Verhältnisse der myeloischen Zelllinien – Granulozyten und Monozyten – glichen sich in allen untersuchten Gruppen. Der Beitrag zur Gesamtzusammensetzung betrug für Granulozyten in der DT-Gruppe $26,5 \pm 0,75\%$, in PBS-Tieren $23,48 \pm 3,92\%$ und in unbehandelten Spendern $22,9 \pm 0,89\%$. Absolut wurden in beiden experimentellen Gruppen erniedrigte Werte gefunden (DT: $3,49 \pm 0,67 \times 10^6$, PBS: $3,5 \pm 1,87 \times 10^6$, Spender: $7,33 \pm 1,38 \times 10^6$). Der Anteil der Monozyten betrug in allen Gruppen in etwa 10% unter allen kernhaltigen Knochenmarkzellen, bei erwartungsgemäß deutlicher Zytopenie in den Transplantatempfängern (DT: $1,29 \pm 0,2 \times 10^6$, PBS: $1,14 \pm 0,18 \times 10^6$, Spender: $3,29 \pm 0,55 \times 10^6$).

3.6.2.1.4 Organinfiltrierende Leukozyten der Lymphknoten

Die Analyse der gepoolten peripheren und mesenterialen Lymphknoten zeigte mit einem Anteil von $80,59 \pm 1,17\%$ aller gefärbten Leukozyten ein dominantes T-Zellkompartiment in der DT-Gruppe. In der PBS-Gruppe fanden wir im Vergleich hierzu signifikant niedrigere prozentuale Anteile, die noch unter den Werten unbehandelter Spender lagen (PBS: $46,89 \pm 5,05\%$, Spender: $56,68 \pm 2,27\%$). In Absolutzahlen machten T-Zellen in den Versuchsgruppen nur einen Bruchteil der Menge von unbehandelten Tieren aus (DT: $0,31 \pm 0,08 \times 10^6$, PBS: $0,09 \pm 0,01 \times 10^6$, Spender: $4,20 \pm 0,88 \times 10^6$).

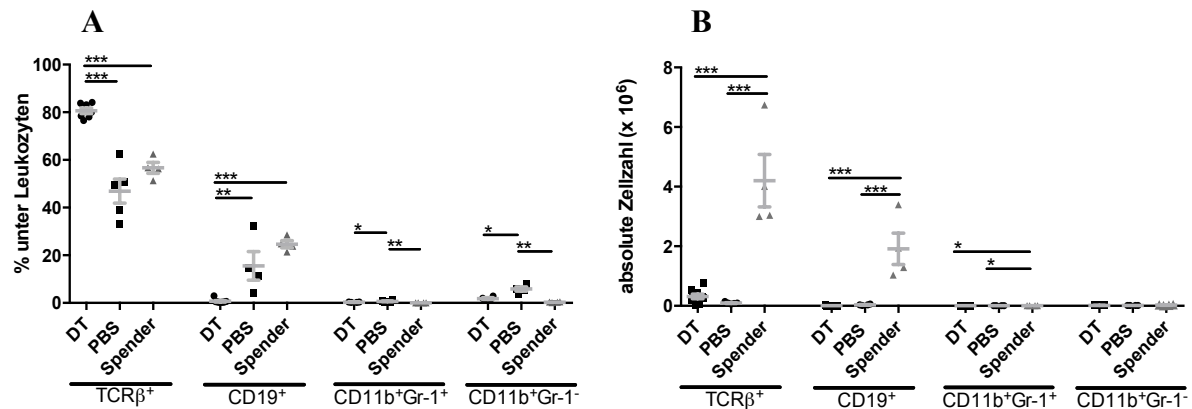


Abb. 45: Leukozytäre Zusammensetzung der gepoolten peripheren und mesenterialen Lymphknoten

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=4-9$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=4-5$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt an d19 (DT) und 20 (PBS) aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

CD8⁺ Lymphozyten machten in den Versuchsgruppen ähnlich große Anteile unter allen T-Zellen aus und waren hochsignifikant gegenüber unbehandelten Spendern erhöht (DT: $71,92 \pm 3,81\%$, PBS: $68,64 \pm 4,41\%$, Spender: $37,4 \pm 1,45\%$).

Umgekehrt hierzu detektierten wir in den Versuchsgruppen signifikant erniedrigte prozentuale Anteile an CD4⁺ Tconv im Vergleich zu unbehandelten Spendern (DT: $25,77 \pm 3,72\%$, PBS: $18,83 \pm 3,88\%$, Spender $54,37 \pm 0,91\%$).

Den Erwartungen entsprechend waren Treg in der DT-Gruppe stark supprimiert und ihre Frequenz unterschritt Vergleichswerte auf der höchsten Signifikanzstufe (DT: $0,47 \pm 0,10\%$, PBS: $6,07 \pm 1,59\%$, Spender: $6,31 \pm 0,49\%$).

Aufgrund der geringeren Zellularität in beiden Versuchsgruppen führten die beobachteten Verschiebungen innerhalb des T-Zellkompartiments nur zu moderaten Veränderungen in absoluten Zellzahlen. Es zeigte sich für alle untersuchten Subsets eine ausgeprägte Zellarmut gegenüber unbehandelten Tieren.

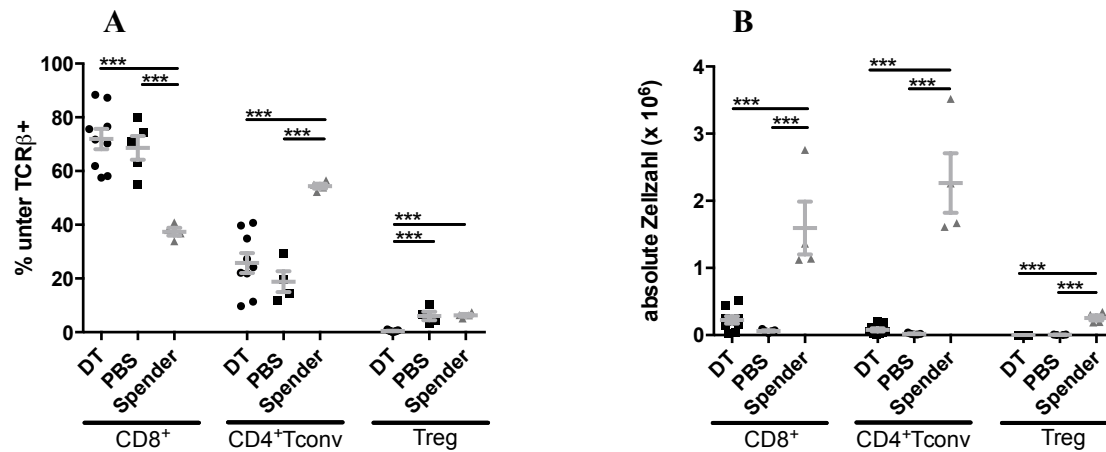


Abb. 46: T-Zell-subsets der gepoolten peripheren und mesenterialen Lymphknoten

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=9$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=4-5$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter T-Zellen (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt an d19 (DT) und 20 (PBS) aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender sind als Referenz mit aufgeführt (graue Dreiecke, $n=4$). Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Einzelwerten. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die B-Zellen in der DT-Gruppe machten nur noch einen marginalen Anteil an allen analysierten Zellen aus und die Werte lagen signifikant unten denen der anderen Gruppen. Der Vergleich zwischen der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern zeigte keinen signifikanten Unterschied (DT: $0,67 \pm 0,29\%$, PBS: $15,57 \pm 5,99\%$, Spender: $24,63 \pm 1,48\%$). In absoluten Zellzahlen waren B-Zellen in beiden Versuchsgruppen hochsignifikant gegenüber unbehandelten Tieren verringert (DT: $0,001 \pm 0,001 \times 10^6$, PBS: $0,03 \pm 0,01 \times 10^6$, Spender: $1,91 \pm 0,53 \times 10^6$).

Der Anteil an Granulozyten unter allen isolierten Zellen war in allen Gruppen sehr gering ($<1\%$). Die absoluten Zellzahlen unterschieden sich kaum und es erscheint unwahrscheinlich, dass die gefundenen Unterschiede biologisch relevant sind. Die Analyse der Monozyten zeigt diskrete Unterschiede in ihrem prozentualen Anteil an allen Zellen. Während in der DT-Gruppe nur $1,83 \pm 0,39\%$ Monozyten gefunden wurde, stellten sie in der PBS-Gruppe anteilmäßig eine signifikant größere Population. Auch gegenüber unbehandelten Spendern zeigte die PBS-Gruppe eine signifikante Erhöhung (PBS: $5,85 \pm 0,86\%$, Spender: $0,31 \pm 0,07\%$). In absoluten Zellzahlen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.6.2.1.5 Zusammenfassung

Die Immunphänotypisierung der reisolierten Lymphozyten zeigte in allen untersuchten Organen Auffälligkeiten, die grundsätzlich mit dem Auftreten einer GVHD vereinbar sind. Bei Analyse zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach alloKMT ergab sich erwartungsgemäß das Bild einer ausgeprägten Leukozytopenie in den experimentellen Gruppen, v.a. bedingt durch die Verminderung an Zellen der adaptiven Abwehr.

Im Speziellen fiel in Treg-depletierten Tieren eine profunde Dezimierung von B-Zellen und eine veränderte Zusammensetzung des T-Zellkompartiments auf, sowie eine Infiltration durch proinflammatorische Granulozyten, was als Zeichen der Immundysregulation mit den histologischen Befunden konsistent ist.

3.6.2.2 Analyse des Dick- und Dünndarms

3.6.2.2.1 Vorbemerkungen und Zellzahlen

Bei der durchflusszytometrischen Analyse fiel bei früher DT-Gabe an d5, 7 und 9 und Aufarbeitung um d20 zunächst die deutliche Zytopenie in den verschiedenen Kompartimenten des gastrointestinalen Trakts im Vergleich zur späten DT-Gabe an d26, 28 und 30 und Analyse um d40 auf. Um Aussagen zu organinfiltrierenden Leukozyten machen zu können, war es häufig erforderlich, die reisolierten Zellen zu poolen. Aufgrund sich hieraus ergebender statistischer Limitationen, sind zusätzliche Aufarbeitungen notwendig, um die gefundenen Ergebnisse zu bestätigen. Wir beschränkten uns bei der Immunphänotypisierung folglich weitestgehend auf das T-Zellkompartiment, dem im Rahmen der aGVHD eine besondere Bedeutung zukommt. Die Markerprofile der untersuchten Zelltypen ist Tab. 7 zu entnehmen (Kapitel 3.6.1.2.1 Vorbemerkungen und Zellzahlen).

Aus der Lamina Propria des Dickdarms konnten in der DT-Gruppe durchschnittlich $1,85 \pm 0,33 \times 10^6$ Zellen pro Maus extrahiert werden, während aus Mäusen der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern geringere Zellzahlen isoliert wurden. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs (Datenpunkte entsprechen teilweise gepoolten Proben) konnte trotz der numerisch auffälligen Unterschiede keine Signifikanz errechnet werden. Unbehandelte Empfänger wiesen in etwa gleiche Mengen organinfiltrierender Leukozyten auf wie Tiere der DT-Gruppe (PBS: $0,87 \pm 0,09 \times 10^6$, Spender: $0,90 \pm 0,14 \times 10^6$, Empfänger $1,78 \pm 0,36 \times 10^6$).

Aus der Lamina Propria des Dünndarms gewannen wir in der DT-Gruppe etwas geringere Zellmengen als aus Geweben der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern. Unbehandelte Empfänger zeigten gegenüber den anderen Gruppen trotz einiger Streuung der Einzelwerte

signifikant größere Zellerträge (DT: $2,43 \pm 0,20 \times 10^6$, PBS: $5,0 \pm 1,79 \times 10^6$, Spender: $3,91 \pm 1,28 \times 10^6$, Empfänger: $15,9 \pm 2,67 \times 10^6$).

In den Laminae Propriae der DT-Gruppe zeigten die analysierten Leukozyten einen vollständigen Spenderchimärismus (homogene Expression des H-2K^b Antigens). Untersuchte Zellen aus den Laminae Propriae der PBS-Gruppe wiesen den stammspezifischen Marker zu mindestens $95,88 \pm 3,64\%$ auf.

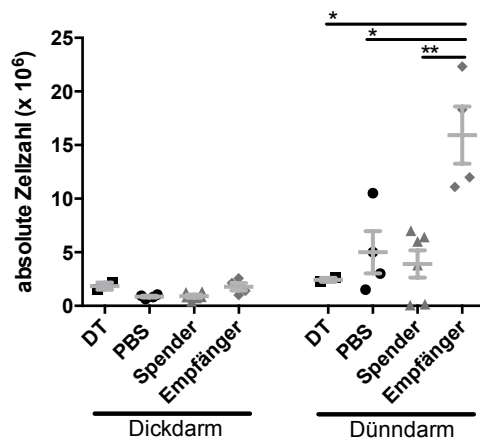


Abb. 47: Absolute Zellzahlen reisolierter Leukozyten aus der Lamina Propria von Dick- und Dünndärmen

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=2$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=4$). Dargestellt sind absolute Zellzahlen reisolierter Leukozyten zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen gemittelten Pooldaten (Ausnahme Dünndarm PBS). Zellpools bestanden aus den vereinigten

Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die Zellausbeute aus dem einschichtigen Deckepithel (IEL) der Dickdärme blieb in allen Gruppen gering und einzelne Proben mussten vor der Immunphänotypisierung gepoolt werden. Die gemittelten Leukozytengehalte zeigten im Vergleich zueinander keine signifikanten Unterschiede. Dennoch konnten wir in der DT-Gruppe einen Trend zu größeren Zellularitäten feststellen (DT: $1,16 \pm 0,18 \times 10^6$, PBS: $0,61 \pm 0,09 \times 10^6$, Spender: $0,89 \pm 0,27 \times 10^6$, Empfänger: $1,03 \pm 0,22 \times 10^6$).

IEL des Dünndarms waren in den experimentellen Gruppen in ähnlichen Quantitäten extrahierbar. Auch unmanipulierte Tiere wiesen bei tendenziell höherer Zellularität als in den Versuchsgruppen vergleichbare Zellgehalte auf (DT: $8,94 \pm 2,82 \times 10^6$, PBS: $8,09 \pm 1,59 \times 10^6$, Spender: $16,8 \pm 3,18 \times 10^6$, Empfänger: $16,6 \pm 2,08 \times 10^6$).

Alle reisolieren Leukozyten aus Geweben der DT-Gruppe exprimierten als Zeichen ihrer vollständigen Rekonstitution aus Spenderknochenmark den stammspezifischen Marker H2-K^b. In der PBS-Gruppe waren noch einige wenige residuelle Empfängerleukozyten im Dickdarmepithel nachweisbar (H-2K^b-Status: $95,1 \pm 4,8\%$).

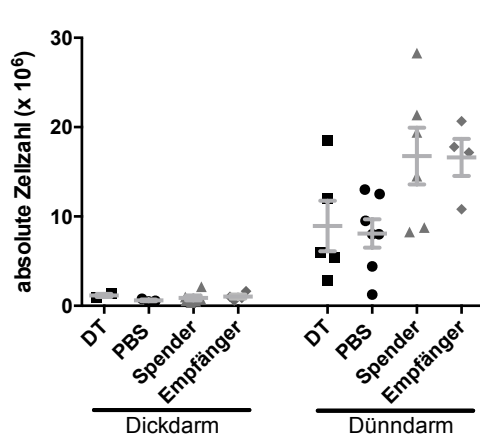


Abb. 48: Absolute Zellzahlen reisolierter Leukozyten aus dem Schleimhautepithel von Dick- und Dünndärmen

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=2-5$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=3-7$). Dargestellt sind absolute Zellzahlen reisolierter Leukozyten zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen gemittelten Pooldaten (Ausnahme Dünndarm PBS/DT) aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

3.6.2.2.2 Organinfiltrierende Leukozyten der Lamina Propria

In der Lamina Propria des Dickdarms machten T-Zellen in der DT-Gruppe im Schnitt $60,4 \pm 1,01\%$ unter allen reisolierten Leukozyten aus, in der PBS-Gruppe nur $31,0 \pm 6,98\%$. Das entspricht in etwa den gefundenen Werten bei später Treg-Elimination (siehe Kapitel 3.6.1.2.2 Organinfiltrierende Leukozyten der Lamina Propria). In absoluten Zellzahlen liegen die Werte bei der frühen Elimination in etwa bei 25% der späten Ausschaltung. In der DT-Gruppe zählten wir $1,12 \pm 0,22 \times 10^6$ Zellen, in der PBS-Gruppe war die Ausbeute mit $0,27 \pm 0,06 \times 10^6$ signifikant geringer.

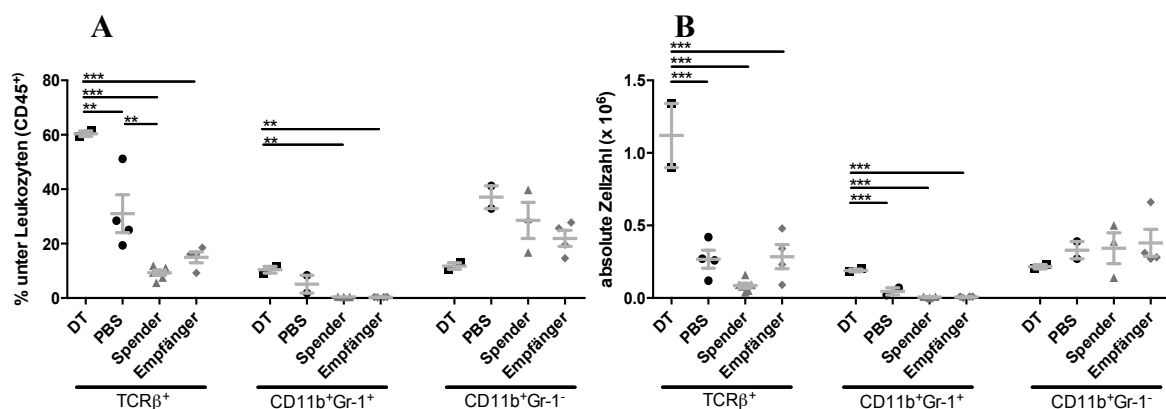


Abb. 49: Leukozytäre Zusammensetzung der Lamina Propria des Dickdarms

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=2$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=2-4$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=3-6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken

indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Poolwerten aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt ($p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).*

Wir konnten ähnlich wie bei der späten Ausschaltung von Treg keine $CD8^+$ Lymphozyten in der Lamina Propria detektieren.

Der Anteil von DN^- T-Zellen war in beiden Versuchsgruppen in etwa vergleichbar und deutlich gegenüber unbehandelten Kontrollen erhöht. Der Vergleich der Versuchsgruppen mit unbehandelten Empfängern zeigte Signifikanz (DT: $53,8 \pm 6,6\%$, PBS: $48,5 \pm 7,52\%$, Spender: $33,7 \pm 3,16\%$, Empfänger: $26,5 \pm 1,67\%$). Es ergaben sich dadurch hochsignifikante Unterschiede im Hinblick auf die absoluten Zellzahlen. In der DT-Gruppe waren mit $0,59 \pm 0,04 \times 10^6$ DN^- Lymphozyten deutlich mehr Zellen nachweisbar als in der PBS-Gruppe und in unbehandelten Tieren. Unterschiede zwischen der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern waren ebenfalls signifikant, jedoch auf niedrigerem Niveau (PBS: $0,13 \pm 0,03 \times 10^6$, Spender: $0,03 \pm 0,01 \times 10^6$, Empfänger: $0,08 \pm 0,02 \times 10^6$).

Ähnlich verhielt es sich bei $CD4^+$ Tconv, wo jeweils ähnlich große Fraktionen – zwischen $38,0 \pm 5,88\%$ in der PBS-Gruppe und $56,4 \pm 3,53\%$ in unbehandelten Empfängern – auf dieses Subset entfielen. Bei Betrachtung der tatsächlichen Zellzahlen ließen sich hochsignifikant mehr Zellen in der DT-Gruppe nachweisen als in der PBS-Gruppe und unbehandelten Tieren (DT: $0,51 \pm 0,17 \times 10^6$, PBS: $0,11 \pm 0,03 \times 10^6$, Spender: $0,04 \pm 0,01 \times 10^6$, Empfänger: $0,16 \pm 0,04 \times 10^6$).

Treg waren in der DT-Gruppe stark dezimiert und stellten nur $0,97 \pm 0,0\%$ aller T-Zellen. Im Vergleich hierzu zeigten Tiere der PBS-Gruppe und unbehandelte Kontrollen erwartungsgemäß deutlich robustere Populationen dieser Zellart (PBS: $12,0 \pm 3,09\%$, Spender: $18,3 \pm 2,85\%$, Empfänger: $16,5 \pm 2,38\%$).

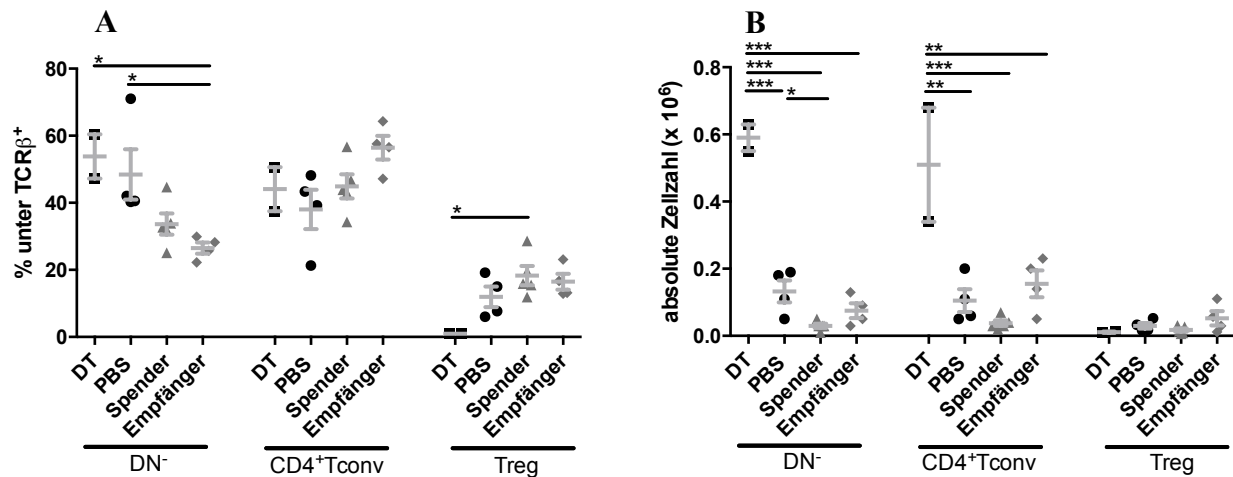


Abb. 50: Subklassifizierung der Lamina Propria ständigen T-Zellen des Dickdarms

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=2$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=4$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter T-Lymphozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=5$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Poolwerten aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die Färbung auf Ki-67 zeigte in der DT-Gruppe bei stark streuenden Einzelwerten keine signifikante Steigerung der Teilungsaktivität von $\text{TCR}\beta^+\text{CD4}^-$ Lymphozyten - entsprechend DN^- T-Zellen - im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen.

CD4^+ Tconv zeigten in den Versuchsgruppen eine signifikant erhöhte Teilungsrate gegenüber unbehandelten Empfängern, nicht jedoch im Vergleich untereinander oder im Bezug zu unbehandelten Spendern (DT: $29,4 \pm 2,7\%$, PBS: $27,6 \pm 2,31$, Spender: $24,1 \pm 3,23\%$, Empfänger: $10,8 \pm 2,97\%$). Treg aller Gruppen zeigten ein vergleichbares Proliferationsverhalten.

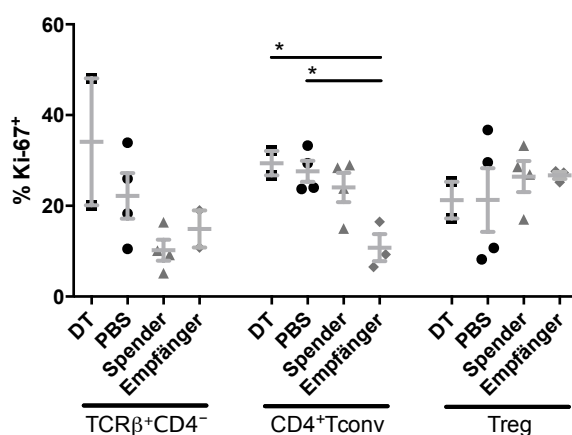


Abb. 51: Untersuchung des Teilungsverhaltens Lamina Propria- ständiger T-Zellen des Dickdarms

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=2$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=4$). Dargestellt ist der prozentuale Anteil proliferierender Lymphozyten, gemessen anhand der Expression des Teilungsmarkers Ki-67, zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke,

$n=4$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=2-3$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Poolwerten aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Weiterhin konnten wir in der DT-Gruppe etwa doppelt so hohe Anteile von Granulozyten unter allen Zellen nachweisen im Vergleich zur PBS-Gruppe. In unbehandelten Kontrollen sind Granulozyten nur im Promillebereich detektierbar (DT: $10,4 \pm 1,24\%$, PBS: $5,11 \pm 3,27\%$, Spender: $0,46 \pm 0,01\%$, Empfänger: $0,33 \pm 0,05\%$). Die Absolutwerte liegen in der DT-Gruppe hochsignifikant über allen anderen Gruppen (DT: $0,19 \pm 0,01 \times 10^6$, PBS: $0,05 \pm 0,03 \times 10^6$). Monozyten stellen in der PBS-Gruppe deutlich größere Fraktion unter allen Leukozyten als in der DT-Gruppe (DT: $11,7 \pm 1,2\%$, PBS: $37,1 \pm 4,17\%$). Weitere Analysen müssten durchgeführt werden, um die gefunden Unterschiede statistisch untermauern zu können. Die absolute Zellzahl war zwischen allen Gruppen vergleichbar und bewegte sich zwischen $0,22 \pm 0,02 \times 10^6$ in DT-Tieren und $0,38 \pm 0,09 \times 10^6$ Zellen in unbehandelten Empfängern.

In der Lamina Propria des Dünndarms beliefen sich die prozentualen Anteile der T-Zellen in der DT-Gruppe auf ähnliche Werte wie in der PBS-Gruppe (DT: $62,4 \pm 13,5\%$, PBS: $67,6 \pm 4,98\%$). Damit betrug der Anteil in beiden Gruppen in etwa das Doppelte von unbehandelten Kontrollen (Spender: $28,9 \pm 1,62\%$ Empfänger: $32,0 \pm 1,64\%$). Die absoluten Zellzahlen zeigten grundsätzlich vergleichbare T-Zellgehalte, wobei ein deutlicher stammspezifischer Unterschied nachweisbar war (Spender: $1,14 \pm 0,45 \times 10^6$, Empfänger: $5,21 \pm 1,1 \times 10^6$).

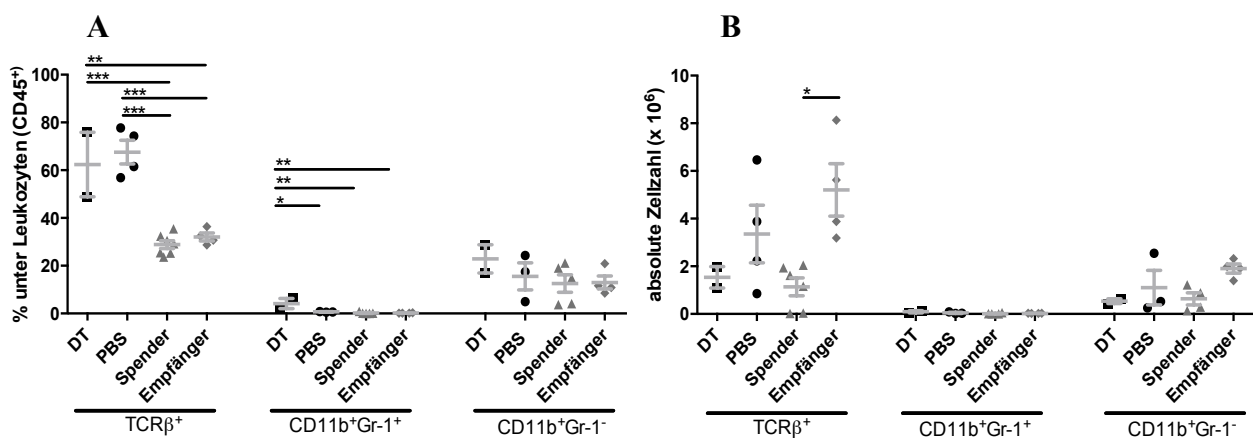


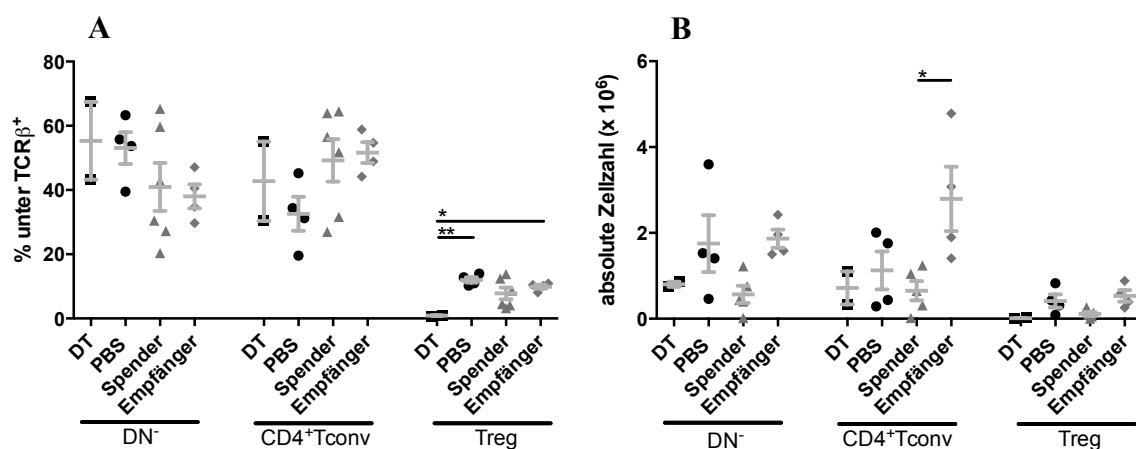
Abb. 52: Leukozytäre Zusammensetzung der Lamina Propria des Dünndarms

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=2$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=3-4$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=4-7$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der PBS-Gruppe entsprechen Einzelwerten, alle übrigen sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die Untersuchung des T-Zellkompartiments erbrachte keine signifikanten Abweichungen zwischen den Gruppen. Der Anteil von DN⁺ T-Zellen zeigte sich in den Versuchsgruppen im Trend gegenüber unbehandelten Kontrollen erhöht (DT: $55,3 \pm 12,1\%$, PBS: $53,1 \pm 4,97\%$, Spender: $41,0 \pm 7,46\%$ Empfänger: $38,1 \pm 3,75\%$). Die Absolutwerte betrugen zwischen $0,8 \pm 0,06 \times 10^6$ in der DT-Gruppe und $1,87 \pm 0,21 \times 10^6$ Zellen in unbehandelten Empfängern.

Im Gegensatz dazu machten in den Versuchsgruppen CD4⁺ Tconv im Schnitt etwas weniger an der Gesamtheit aller T-Zellen aus als in den Kontrollen (DT: $42,7 \pm 12,4\%$, PBS: $32,6 \pm 5,28\%$ Spender: $49,2 \pm 6,62\%$, Empfänger: $51,7 \pm 3,21\%$). Die tatsächlichen Mengen von CD4⁺ Tconv glichen sich in den Versuchsgruppen und unbehandelten Spendern. Empfänger zeigten bei recht großer Streuung der Einzelwerte die größten Populationen (DT: $0,72 \pm 0,39 \times 10^6$, PBS: $1,13 \pm 0,44 \times 10^6$, Spender: $0,65 \pm 0,23 \times 10^6$, Empfänger: $2,79 \pm 0,75 \times 10^6$).

Treg stellten nach der Behandlung mit DT nur noch $0,91 \pm 0,12\%$ an allen T-Zellen und blieben damit erwartungsgemäß deutlich unter Werten der PBS-Gruppe ($12,0 \pm 0,84\%$) und unbehandelten Kontrollen (Spender: $7,8 \pm 1,86\%$, Empfänger: $9,89 \pm 0,61\%$).

**Abb. 53: Subklassifizierung der Lamina Propria- ständigen T-Zellen des Dünndarms**

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=2$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=4$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter T-Lymphozyten (A) und absolute

Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=5-6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der PBS-Gruppe entsprechen Einzelwerten, alle übrigen sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt ($*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$).

TCR β^+ CD4 $^-$ Lymphozyten zeigten in Dünndärmen der DT-Gruppe eine erhöhte Teilungsaktivität gegenüber Tieren der PBS-Gruppe und unbehandelten Empfängern. Unterschiede gegenüber unbehandelten Spendern erreichten knapp keine Signifikanz (DT: $34,4 \pm 4,25\%$, PBS: $14,4 \pm 1,95\%$, Spender: $16,8 \pm 4,19\%$, Empfänger: $9,9 \pm 2,2\%$).

Die Proliferationsrate von CD4 $^+$ Tconv war in der DT-Gruppe nicht signifikant gegenüber den Vergleichsgruppen gesteigert (DT: $25,6 \pm 3,95\%$, PBS: $18,0 \pm 2,25\%$, Spender: $18,7 \pm 3,28\%$, Empfänger: $15,4 \pm 2,90\%$).

Die Teilungsrate von Treg der DT-Gruppe lag im Trend über der der PBS-Gruppe und damit in etwa auf dem Niveau unbehandelter Tiere. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (DT: $22,0 \pm 8,65\%$, PBS: $11,3 \pm 2,72$, Spender: $24,3 \pm 2,89\%$, Empfänger: $25,1 \pm 3,87\%$).

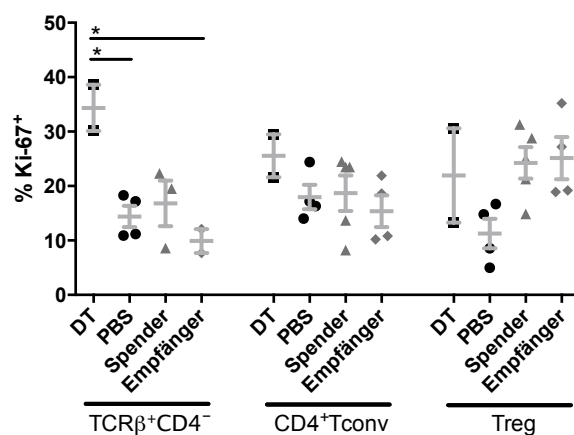


Abb. 54: Untersuchung des Teilungsverhaltens Lamina Propria- ständiger T-Zellen des Dünndarms

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=2$) oder PBS (schwarze Kreise $n=4$). Dargestellt ist der prozentuale Anteil proliferierender Lymphozyten, gemessen anhand der Expression des Teilungsmarkers Ki-67, zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=3-5$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=2-4$) sind als

Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der PBS-Gruppe entsprechen Einzelwerten, alle übrigen sind Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt ($*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$).

Wir fanden in Dünndärmen der DT-Gruppe signifikant erhöhte Anteile an Granulozyten ($4,16 \pm 2,13\%$) im Vergleich zu den anderen Gruppen (PBS: $0,67 \pm 0,08\%$, Spender: $0,22 \pm 0,16\%$, Empfänger: $0,17 \pm 0,05\%$). Diese Unterschiede waren in absoluten Zellzahlen nicht

reproduzierbar. Weiterhin detektierten wir keine robusten Unterschiede im prozentualen oder absoluten Anteil von Monozyten unter allen reisolierten Leukozyten.

3.6.2.2.3 Intraepitheliale Lymphozyten

Im Dickdarm handelte es sich bei den gewonnenen Zellen der Versuchsgruppen fast ausschließlich um $\text{TCR}\beta^+$ Lymphozyten (DT: $83,3 \pm 3,31\%$, PBS: $90,1 \pm 0,63\%$). In unbehandelten Kontrollen machten $\text{TCR}\beta^+$ Zellen nur knapp die Hälfte aller Zellen aus (Spender: $53,3 \pm 3,02\%$, Empfänger: $51,6 \pm 2,29\%$). Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und den unbehandelten Tieren waren jeweils statistisch hochsignifikant.

In der DT-Gruppe ergaben sich so gegenüber den anderen Gruppen eindrücklich erhöhte Zellzahlen, für die allerdings aufgrund der geringen Menge an Einzelwerten keine Signifikanz errechnet werden konnte (DT: $0,97 \pm 0,18 \times 10^6$, PBS: $0,55 \pm 0,08 \times 10^6$, Spender $0,53 \pm 0,17 \times 10^6$, Empfänger: $0,53 \pm 0,12 \times 10^6$).

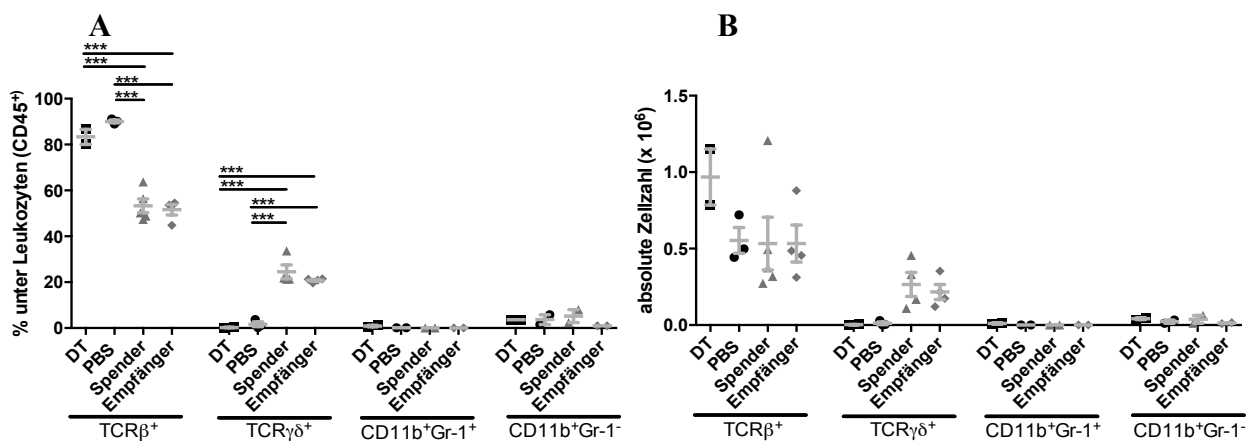


Abb. 55: Leukozytäre Zusammensetzung des Dickdarmepithels

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=2$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=2-3$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=2-5$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=2-4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Poolwerten aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Der Großteil $\text{TCR}\beta^+$ Lymphozyten exprimierte in den Versuchsgruppen das Oberflächenantigen CD8. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der

DT-Gruppe und der PBS-Gruppe, jedoch jeweils im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (DT: $83,3 \pm 4,3\%$, PBS: $89,1 \pm 1,25\%$, Spender: $59,5 \pm 2,91\%$, Empfänger: $50,0 \pm 3,27\%$). Der Vergleich der DT-Gruppe mit den anderen Gruppen zeigte zum Teil recht deutliche Unterschiede in der absoluten Zellzahl, jedoch erwiesen sich die Abweichungen nicht als signifikant (DT: $0,80 \pm 0,11 \times 10^6$, PBS: $0,34 \pm 0,11 \times 10^6$, Spender: $0,25 \pm 0,04 \times 10^6$, Empfänger: $0,27 \pm 0,07 \times 10^6$).

Der Aufbau des $\text{TCR}\beta^+\text{CD8}^+$ Kompartiments zeigte eine vergleichbare Verteilung der $\text{CD8}\alpha\beta^+$ und $\text{CD8}\alpha\alpha^+$ -Subsets wie für die späte Treg-Elimination an d26, 28 und 30 nach alloKMT bereits beschrieben (vgl. Kapitel 3.6.1.2.3 Intraepitheliale Lymphozyten). In den Versuchsgruppen waren im Gegensatz zu unbehandelten Tieren nur noch spärliche Fraktionen von $\text{CD8}\alpha\alpha^+$ T-Zellen nachweisbar (DT: $0,52 \pm 0,21\%$, PBS: $1,48 \pm 1,13\%$, Spender: $83,4 \pm 4,65\%$, Empfänger: $82,6 \pm 1,97\%$, Daten nicht gezeigt).

DN^- Lymphozyten waren prozentual und absolut in beiden experimentellen Gruppen gegenüber unbehandelten Tieren auf marginale Werte erniedrigt, wobei zwischen der DT-Gruppe und der PBS-Gruppe keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden (DT: $1,25 \pm 0,49\%$ entsprechend $0,01 \pm 0,003 \times 10^6$, PBS: $1,32 \pm 0,61\%$ entsprechend $0,01 \pm 0,002 \times 10^6$, Spender: $29,3 \pm 3,07\%$ entsprechend $0,14 \pm 0,03 \times 10^6$, Empfänger: $20,2 \pm 2,18\%$ entsprechend $0,10 \pm 0,02 \times 10^6$).

Für CD4^+ Tconv detektierten wir in beiden experimentellen Gruppen und unbehandelten Spendern nur geringe Unterschiede im prozentualen Anteil an allen $\text{TCR}\beta^+$ Lymphozyten. Unbehandelte Empfänger zeigten bei geringer Streuung signifikant erhöhte Anteile dieses T-Zell-Subsets (DT: $15 \pm 4,75\%$, PBS: $8,2 \pm 0,55\%$, Spender: $6,72 \pm 1,43\%$, Empfänger: $25,8 \pm 1,05\%$). Die Absolutwerte glichen sich in allen Gruppen.

Treg bildeten in allen untersuchten Gruppen nur kleine Fraktionen innerhalb $\text{TCR}\beta^+$ Zellen und die Auswirkungen der DT-Behandlung waren deshalb nur diskret. Unterschiede waren nur im Bezug zu unbehandelten Empfängern, welche etwas größere Anteile aufwiesen, signifikant (DT: $0,24 \pm 0,11\%$, PBS: $0,50 \pm 0,11\%$, Spender: $0,83 \pm 0,28\%$, Empfänger: $3,59 \pm 0,43\%$). Die absoluten Treg-Mengen waren in allen Gruppen gering und zeigten keine signifikanten Unterschiede.

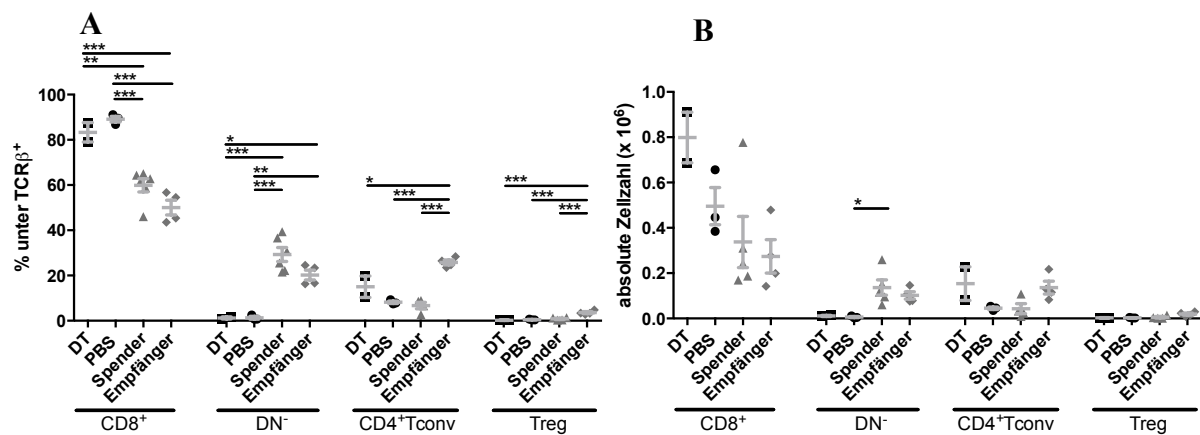


Abb. 56: Subklassifizierung der intraepithelialen TCRβ⁺ Lymphozyten des Dickdarms

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=2$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=3$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter TCRβ⁺ Lymphozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=4-6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte entsprechen Poolwerten aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die Datenlage zum Proliferationsverhalten der einzelnen T-Zell-Subsets ist dünn und weitere Aufarbeitungen müssten für fundierte Aussagen durchgeführt werden. Die Teilungsaktivität von TCRβ⁺CD4⁻ Zellen scheint in der DT-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern erhöht zu sein. CD4⁺ Tconv zeigen im Gruppenvergleich in DT-Tieren die höchsten Teilungsraten.

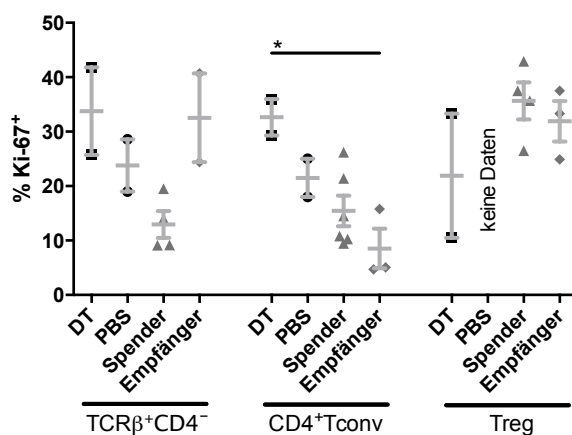


Abb. 57: Untersuchung des Teilungsverhaltens intraepithelialer TCRβ⁺ T-Zellen des Dickdarms

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=2$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=2$). Dargestellt ist der prozentuale Anteil proliferierender Lymphozyten, gemessen anhand der Expression des Teilungsmarkers Ki-67 zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=4-6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=2-3$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren

SEMs. Datenpunkte entsprechen Poolwerten aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt ($p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).*

Die Analysen zeigten darüber hinaus ein nahezu vollständiges Fehlen von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ Lymphozyten in beiden experimentellen Gruppen. Es zeigten sich hochsignifikante Unterschiede im Vergleich des prozentualen Anteil dieser T-Zelllinie an allen isolierten Leukozyten zwischen experimentellen Gruppen und unbehandelten Tieren, nicht aber für ihre tatsächliche Zellzahl (DT: $0,24 \pm 0,13\%$ entsprechend $0,003 \pm 0,002 \times 10^6$, PBS: $1,66 \pm 1,04\%$ entsprechend $0,01 \pm 0,009 \times 10^6$, Spender: $24,5 \pm 3,03\%$ entsprechend $0,27 \pm 0,08 \times 10^6$, Empfänger $20,8 \pm 0,42\%$ entsprechend $0,22 \pm 0,05 \times 10^6$, Daten nicht gezeigt).

Granulozyten waren an der Gesamtzusammensetzung reisolierter Leukozyten deutlich unterrepräsentiert und nur schwer nachzuweisen. Maximale Werte fanden sich in der DT-Gruppe mit prozentualen Beiträgen von $0,87 \pm 0,34\%$. Der Vergleich der prozentualen Anteile zeigte ebenso wenig signifikante Unterschiede wie deren tatsächliche Zellzahl. Für Monozyten detektierten wir in den einzelnen Gruppen keine signifikant unterschiedlichen Anteile an allen Leukozyten. Die gefundenen Werte lagen zwischen $0,96 \pm 0,01\%$ in unbehandelten Empfängern und $5,21 \pm 2,82\%$ in unbehandelten Spendern. Wir fanden keine signifikanten Unterschiede in deren absoluter Zellzahl.

Wie für das intraepitheliale Kompartiment des Dickdarms beschrieben, fiel auch bei der Analyse der Leukozytenzusammensetzung im Dünndarm eine starke Dominanz von $\text{TCR}\beta^+$ Lymphozyten in den Versuchsgruppen auf. Unbehandelte Tiere wiesen große stamm-spezifische Unterschiede im Anteil von $\text{TCR}\beta^+$ Lymphozyten an allen $\text{CD}45^+$ Leukozyten auf. Dies ist ähnlich wie bei später Treg-Elimination beobachtet (vgl. Kapitel 3.6.1.2.3 Intraepitheliale Lymphozyten). Im Vergleich zu Tieren der KMT-Gruppen waren die Anteile in unbehandelten Tieren hochsignifikant niedriger (DT: $83,4 \pm 2,09\%$, PBS: $88,6 \pm 1,39\%$, Spender: $34,8 \pm 1,84\%$, Empfänger: $68,1 \pm 1,4\%$). Bezogen auf absolute Zellzahlen ergaben sich so wieder vergleichbare Werte, die sich zwischen $5,80 \pm 1,41 \times 10^6$ (Spender) und $11,3 \pm 1,39 \times 10^6$ (Empfänger) bewegten.

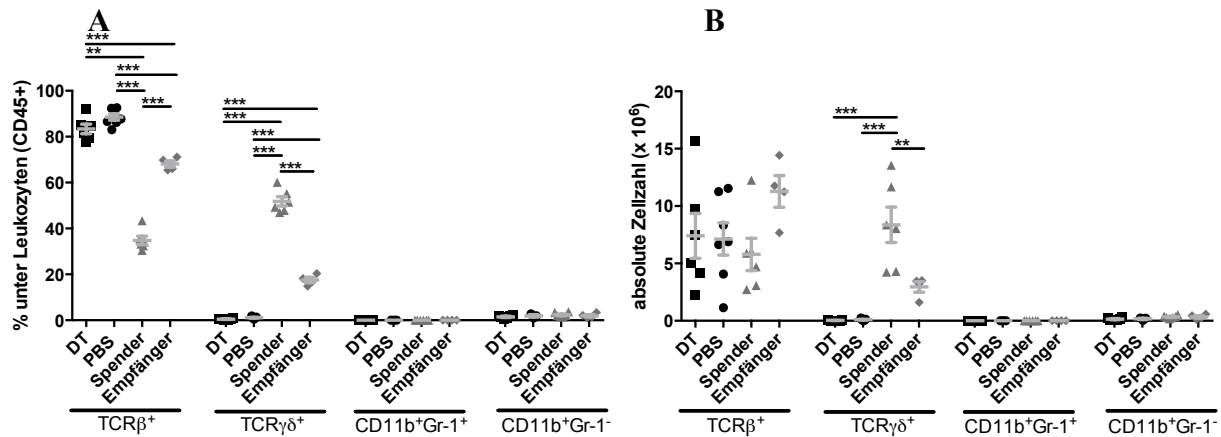


Abb. 58: Leukozytäre Zusammensetzung des Dünndarmepithels

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=6$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=3-7$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter analysierten Leukozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der Versuchsgruppen entsprechen Einzelwerten, bei unbehandelten Tieren handelt es sich um Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließend Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Bei den detektierten $\text{TCR}\beta^+$ Lymphozyten handelte es sich fast ausschließlich um CD8^+ Zellen. Ihr Anteil unterschied sich in den Versuchsgruppen nur geringfügig voneinander. Im Vergleich zu unbehandelten Empfängern fanden wir für die PBS-Gruppe signifikante Unterschiede (DT: $84,1 \pm 4,28\%$, PBS: $85,2 \pm 2,64\%$, Spender: $73,7 \pm 2,71\%$, Empfänger: $70,2 \pm 2,11\%$). Auf absolute Zellzahlen berechnet ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

$\text{TCR}\beta^+\text{CD8}^+$ Lymphozyten zeigten in den Versuchsgruppen ähnlich wie bei der späten Ausschaltung von Treg eine nahezu homogene Konstitution aus dem $\text{CD8}\alpha\beta^+$ -Subset mit minimalen Anteilen von $\text{CD8}\alpha\alpha^+$ T-Zellen (DT: $0,74 \pm 0,17\%$, PBS: $2,52 \pm 0,84\%$, Spender: $54,43 \pm 4,3\%$, Empfänger: $60,23 \pm 2,72\%$, Daten nicht gezeigt, vgl. Kapitel 3.6.1.2.3 Intraepitheliale Lymphozyten).

DN^- Lymphozyten waren sowohl bei prozentualer, als auch bei absoluter Betrachtung in den Versuchsgruppen und unbehandelten Spendern in ähnlich geringen Dimensionen vertreten. Unbehandelte Empfänger wiesen demgegenüber signifikant erhöhte prozentuale Anteile innerhalb des $\text{TCR}\beta^+$ Kompartiments und absolut erhöhte Werte gegenüber allen anderen Gruppen auf (DT: $4,4 \pm 1,11\%$ entsprechend $0,30 \pm 0,11 \times 10^6$, PBS: $2,95 \pm 0,64\%$

entsprechend $0,21 \pm 0,06 \times 10^6$, Spender: $4,0 \pm 0,55\%$ entsprechend $0,20 \pm 0,02 \times 10^6$, Empfänger: $8,4 \pm 1,3\%$ entsprechend $0,90 \pm 0,06 \times 10^6$).

Für $CD4^+$ Tconv konnten wir im Trend einen erhöhten Anteil am $TCR\beta^+$ Kompartiment in der DT-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe feststellen (DT: $11,3 \pm 3,6\%$, PBS: $0,02 \pm 0,004\%$). Der Vergleich der Absolutwerte zeigte allerdings keine Signifikanz.

Treg waren wie erwartet in der DT-Gruppe gegenüber Tieren der PBS-Gruppe und unbehandelten Spendern stark unterrepräsentiert (DT: $0,15 \pm 0,06\%$, PBS: $1,89 \pm 0,53\%$, Spender: $1,13 \pm 0,18\%$). Die Unterschiede in ihrer Frequenz unter $TCR\beta^+$ Lymphozyten zeigten Signifikanz, nicht aber der Vergleich ihrer tatsächlichen, marginalen Anzahl.

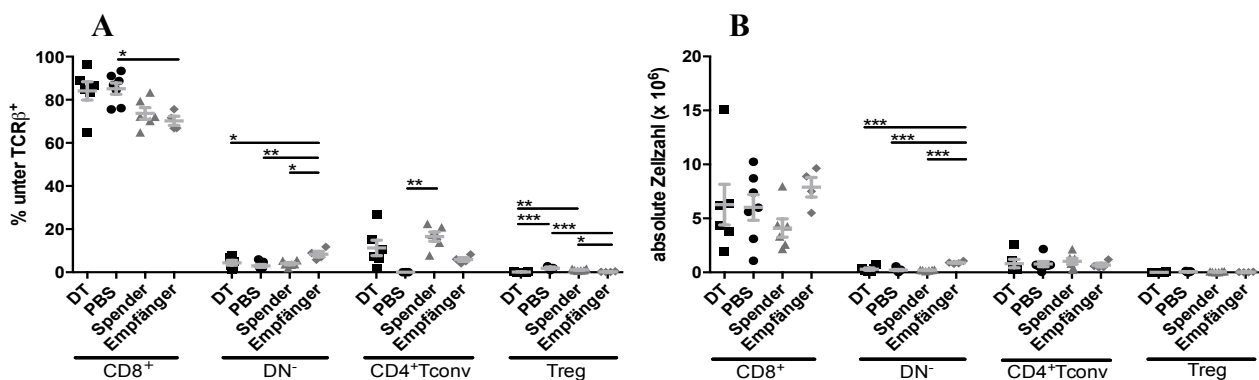


Abb. 59: Subklassifizierung der intraepithelialen $TCR\beta^+$ Lymphozyten des Dünndarms

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=6$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=3-7$). Dargestellt sind jeweils prozentuale Anteile unter $TCR\beta^+$ Lymphozyten (A) und absolute Zellzahlen (B) zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der Versuchsgruppen entsprechen Einzelwerten, bei unbehandelten Tieren handelt es sich um Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren (absolute Zellzahlen sind gemittelt/Tier). Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Wir konnten keine auffälligen Unterschiede im Teilungsverhalten von $TCR\beta^+CD4^-$ Zellen oder $CD4^+$ Tconv zwischen den Gruppen feststellen.

Treg zeigen in der DT-Gruppe eine höhere Proliferationstendenz als in der PBS-Gruppe. Die für die unbehandelten Tiere detektierten Werte liegen allerdings deutlich und teilweise hochsignifikant über den Werten der Versuchsgruppen (DT: $25,5 \pm 4,46\%$, PBS: $13,8 \pm 3,17\%$, Spender: $54,6 \pm 5,74\%$, Empfänger: $39,2 \pm 4,55\%$).

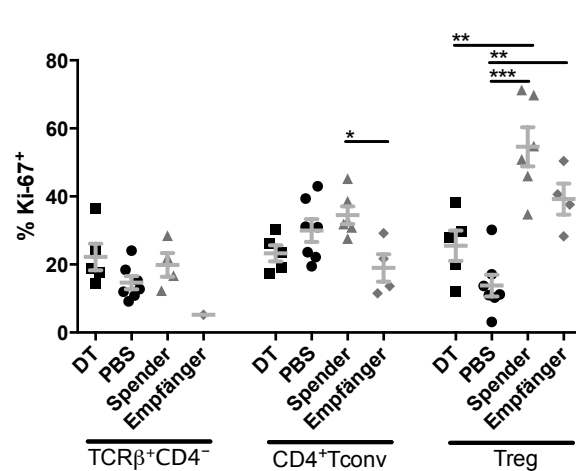


Abb. 60: Untersuchung des Teilungsverhaltens intraepithelialer TCR β^+ T-Zellen des Dünndarms

Versuchstiere erhielten an d5, 7 und 9 nach alloKMT ($2,5 \times 10^6$ KMges) entweder DT (schwarze Quadrate, $n=5$) oder PBS (schwarze Kreise, $n=7-8$). Dargestellt ist der prozentuale Anteil proliferierender Lymphozyten, gemessen anhand der Expression des Teilungsmarkers Ki-67 zum Analysezeitpunkt um d20 aus zwei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Spender (graue Dreiecke, $n=4-6$) und Empfänger (graue Rhomben, $n=1-4$) sind als Referenz mit aufgeführt. Die Fehlerbalken indizieren SEMs. Datenpunkte der Versuchsgruppen entsprechen Einzelwerten, bei unbehandelten Tieren handelt es sich um Poolwerte aus vereinigten Leukozyten von $2 \leq n \leq 6$ Tieren. Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse mit Anova-One-Way und anschließendem Bonferroni-backtest durchgeführt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen waren in beiden Versuchsgruppen nahezu vollständig eradiziert, während die physiologische Quantität dieser Zellart in unbehandelten Tieren einen beträchtlichen Anteil zum Aufbau des Zellkompartiments beitrugen. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen einerseits und unbehandelten Tieren andererseits, sowie zwischen den beiden unbehandelten Mausstämmen waren hochsignifikant (DT: $0,45 \pm 0,10\%$ entsprechend $0,04 \pm 0,01 \times 10^6$, PBS: $1,09 \pm 0,17\%$ entsprechend $0,1 \pm 0,03 \times 10^6$, Spender: $51,8 \pm 2,05 \%$ entsprechend $8,37 \pm 1,54 \times 10^6$, Empfänger: $17,6 \pm 1,17\%$ entsprechend $2,95 \pm 0,45 \times 10^6$, Daten nicht gezeigt).

Der Anteil der Granulozyten betrug in keiner Gruppe mehr als $0,04 \pm 0,02 \%$ (DT-Gruppe) und auch Monozyten repräsentierten nur einen verschwindend kleinen Anteil an allen gefärbten Leukozyten. Prozentuale und absolute Unterschiede blieben ohne statistische Signifikanz.

3.6.2.2.4 Zusammenfassung

Aus intestinalen Geweben von Tieren, welche bereits um d20 nach alloKMT aufgearbeitet wurden, konnten im Vergleich zu der späteren Aufarbeitung um d40 nach alloKMT deutlich geringere Mengen an Entzündungszellen reisoliert werden. Aus diesem Grund mussten die Zellausbeuten zur immunphänotypischen Analyse häufig gepoolt werden. Trotz der sich dadurch ergebenden statistischen Einschränkungen, zeichneten sich bei Betrachtung einzelner Leukozytenklassen interessante Unterschiede ab. So dominierten in Dickdärmen von

transplantierten Tieren $\text{TCR}\beta^+$ T-Zellen den Gesamtpool an untersuchten Leukozyten. Treg-depletierte Tiere zeigten hochsignifikant größere Populationen an DN^- Lymphozyten und CD4^+ Tconv in der Lamina Propria als PBS-Tiere und unbehandelte Kontrollen. Gleichzeitig konnten in den Laminae Propriae beider Darmabschnitte bei Tieren der DT-Gruppe bedeutendere Fraktionen an Granulozyten nachgewiesen werden als in den anderen Gruppen. In Dickdärmen konnte diese Verschiebung in absoluten Zellzahlen reproduziert werden. In Epithelien von transplantierten Tieren fielen dezimierte prozentuale Anteile von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ T-Zellen unter allen Leukozyten und ein absoluter Mangel dieser Zellart auf.

4 Diskussion

Die allogene Knochenmarktransplantation (alloKMT) ist eine potentiell kurative Therapiemodalität für Patienten mit meist bösartigen Erkrankungen des blutbildenden Systems sowie für manche Patienten mit genetischen Störungen der Hämatopoese [69, 89]. Den dabei zusammen mit den pluripotenten Stammzellen übertragenen Spender-T-Zellen kommt eine ambivalente Rolle zu, vermitteln sie doch neben einer Vielzahl gewünschter Effekte [62, 65, 90] auch die akute *graft-versus-host-disease* (aGVHD) [91], die für die beträchtliche Mortalität und Morbidity dieses Verfahrens verantwortlich ist und die Indikationsstellung zur alloKMT entscheidend limitiert [92]. Zur Beherrschung dieser z.T. lebensbedrohlichen Komplikation nach alloKMT ist der Einsatz von breit wirkenden Immunsuppressiva Goldstandard, was jedoch zum einen das Risiko für opportunistische Infektionen erhöht und zum anderen das Rückfallrisiko bei maligner Grunderkrankung steigert [91]. Folglich besteht ein großes klinisches Interesse an der Erforschung von Immunsystem-intrinsischen Mechanismen, die zur peripheren Toleranz beitragen und im Rahmen der KMT zur Toleranzinduktion ausgenutzt werden können. Übergreifendes Ziel dieser Bemühungen ist die Trennung gewünschter (GVL) von schädlichen T-Zell-Effekten (GVHD) nach alloKMT [93]. Ein vielversprechender Ansatz basiert auf dem Einsatz von Spender-Treg in der Prophylaxe und Therapie der GVHD. So konnte im murinen Modell für verschiedene Stammkombinationen gezeigt werden, dass frisch isolierte oder *ex vivo* aktivierte Spender-Treg selbst keine aGVHD auslösen, ihre Beimengung zu konventionellen Spender-T-Zellen (Tconv) jedoch dosisabhängig die Schwere und Letalität der entstehenden aGVHD positiv beeinflussen [80, 94, 95]. Weiterhin konnte die nachträgliche Infusion von Spender-Treg eine bereits etablierte aGVHD (abhängig vom Grad der MHC-Disparität) kontrollieren [96]. Erste klinische Untersuchungsergebnisse, die die Rolle von adoptiv transferierten Spender-Treg für die Prävention der aGVHD am Menschen adressieren, sind vielversprechend [63, 97].

Die Beobachtung, dass die Transplantation von Gesamt-Knochenmark (KMges) über komplette MHC-Grenzen hinweg im letal bestrahlten Empfänger keine aGVHD auslöst, obwohl reife Spender-Tconv in geringer Menge physiologisch enthalten sind, verwundert zunächst angesichts der von Billingham 1966 formulierten Postulate [70]. Eine Erklärung

hierfür könnte in der speziellen Komposition des medullären Leukozytenpools liegen, der sich durch eine für den Organismus einzigartige Abundanz von regulatorisch aktiven Zelltypen – darunter natürliche Killer-T-Zellen (NKT), CD4⁺CD8⁻ T-Zellen und Treg – auszeichnet [80, 98, 99].

Während das GVHD-protective Potential adoptiv übertragener Spender-Treg im Kontext der alloKMT zunehmend evident wird, war es Ziel dieser Dissertation, die spezifische Rolle der bereits im KM-Transplantat enthaltenen Treg zu klären. Hierfür wurde ein MHC-differentes KMT-Modell (C57BL/6 (H-2^b) → BALB/c (H-2^d)) eingesetzt [100] und anstelle der Wildtyp-Maus die Foxp3DTRgfp-Maus als Transplantatspender verwendet. Nach letaler Bestrahlung (9Gy) wurden 2,5 Mio. KMges transplantiert, so dass durch die Foxp3-spezifische Expression des hochaffinen humanen Diphtherie-Toxin-Rezeptors [10] Spender-Treg zu beliebigen Zeitpunkten nach alloKMT selektiv eliminiert werden konnten [84, 86]. Es wurde ein früher Zeitpunkt (d5, 7 und 9 nach alloKMT) mit noch unvollständiger hämatopoetischer Rekonstitution gewählt, sowie ein später Zeitpunkt (d26, 28 und 30 nach alloKMT), zu dem die Hämatopoese fast vollständig regeneriert ist und die Tiere komplett chimär waren. Überraschenderweise zeigte sich, dass die Depletion von Spender-Treg in bis dahin gesunden Transplantatempfängern ausreichte, um eine fulminante und rasch letal verlaufende GVHD auszulösen. Um die Diagnose zu bestätigen, wurden solche Transplantatempfänger an d39 und 40 (d14 bzw. 15 nach erstmaliger DT-Gabe) vergleichend untersucht und histologisch deutliche Zeichen der GVHD in Dick- und Dünndarm nachgewiesen [74], deren Schwere mittels anerkannter aGVHD-Scores quantifiziert wurde [88].

Die feingeweblichen Veränderungen nach Treg-Depletion belegten vor allem im Dickdarm auffällige Abweichungen von der physiologischen Schleimhautarchitektur mit massiven leukozytären Infiltraten, gesteigerten Apoptosereaten sowie epithelialregeneratorischen Arealen. Diese Veränderungen unterscheiden sich nicht von der Histologie konventioneller GVHD-Modelle der eigenen Arbeitsgruppe (unpublizierte Daten) oder von GVHD-Daten anderer Arbeitsgruppen, deren Ergebnisse sich je nach Aufarbeitungstag [81] und Zusammensetzung des Transplantats [101, 102] nur quantitativ von unseren eigenen unterschieden. Besonders beeindruckend und in Übereinstimmung mit Erkenntnissen aus einem anderen aGVHD-Modell sowie mit Ergebnissen der klinischen aGVHD Forschung [103] war der fast vollständige Verlust von Paneth-Zellen. Paneth-Zellen residieren nahe des Dünndarm-Kryptengrundes und sezernieren eine Reihe von α -Defensinen, die für die epitheliale Barriere von entscheidender Bedeutung sind und maßgeblich zur Homöostase des intraluminalen Mikrobioms beisteuern [104]. Darüber hinaus scheinen Paneth-Zellen zur

Integrität der epithelialen Stammzellnische beizutragen und fördern dadurch die Geweberegeneration [105]. Zwar wiesen auch Versuchstiere der PBS-Gruppe früh nach Radiatio eine geringe Verminderung der Paneth-Zellen auf [104], ihre völlige Zerstörung scheint hingegen pathognomonisch für die schwere aGVHD zu sein. Um die Auslösung der GVHD durch alleinige Treg-Depletion zu bestätigen, wurden an Dick- und Dünndarmschnitten zusätzlich immunhistochemische Färbung auf den Treg-spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 [10] durchgeführt und das Verteilungsmuster und die Frequenz der Zellen bestimmt. Die fast vollständige Depletion der Treg wurde in diesen Untersuchungen bestätigt. Hierbei wurde zur besseren Objektivierbarkeit ein computergestütztes Auswertungsverfahren etabliert, das über optische Parameter Diaminobenzidin (DAB)-gefärbte Treg quantifiziert und ihr Vorkommen in Bezug zu allen kernhaltigen Zellen in Form eines *Scattergramms* quantifiziert. Anders als in der naiven Foxp3DTRgfp-Maus, wo die zeitlich begrenzte Gabe von DT in derselben Dosierung nur eine transiente Treg-Depletion bewirkt und nach einer Latenz von wenigen Tagen die Treg-Regeneration im Thymus und wenig später auch in Peripherie (Milz, Blut, LK) nachweisbar sind ([84], unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe), wiesen Transplantationsempfänger nach DT-Gabe eine anhaltende Treg-Defizienz auf. Mäuse der GVHD-freien PBS-Gruppe zeigten dagegen robuste mukosale Treg-Vorkommen, welche im Vergleich zu unbehandelten Spendern und Empfängern sogar überschießend regenerierten und die gastrointestinale Mukosa infiltrierten. In nicht-transplantierten Tieren waren Treg (wie publiziert) präferentiell in organisierten Immunkompartimenten des GI-Traktes nachweisbar [106], die für die Treg-Quantifizierung im Rahmen dieser Arbeit bewusst nicht berücksichtigt wurden. Die insuffiziente Treg-Regeneration bei aGVHD passt zu klinischen Untersuchungen, in denen ebenfalls eine Reduktion der mukosalen Treg-Frequenz bei aGVHD nachgewiesen wurde [107]. Darüber hinaus zeigten klinische Untersuchungen, dass eine verminderte Treg-Frequenz im Transplantat mit einem erhöhten aGVHD-Risiko assoziiert ist [80, 108] bzw. das Auftreten einer aGVHD durch die verringerte Treg-Frequenzen im Blut noch vor Ausbruch der Erkrankung antizipiert werden kann [109]. Im Rahmen der aGVHD werden für die Generierung und Reifung von Treg wichtige Immunkompartimente wie das KM und der Thymus empfindlich geschädigt [69, 110, 111]. Im Unterschied zu nicht transplantierten Tieren, in denen sich das Treg-Kompartiment nach Depletion auch im Intestinum rasch wieder erholt (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe), scheinen die Vorschäden nach Transplantation und die Initiierung der Alloreaktion die Regeneration des Treg-Kompartiments empfindlich zu stören. Zusammengefasst unterstreichen diese

Beobachtungen die Notwendigkeit eines funktionellen Treg-Kompartments nach alloKMT und zeigen, dass bereits die transiente Treg-Depletion im untersuchten Modell zu persistierenden Defekten im Treg-Kompartiment führt und eine letale aGVHD induziert.

Lymphatische Organe sind ein wichtiges Zielorgan der aGVHD und histologisch erscheinen lymphatische Organe wie die Milz, LK und der Thymus 60d nach MHC-differenter alloKMT hypoplastisch und fibrosiert, wie Nguyen *et al.* für Tiere mit aGVHD zeigen konnten [112]. Zur genaueren Untersuchung der zellulären Kompartimente wurden deshalb Leukozyten aus einer Reihe von Organen isoliert und mittels Vielfarbandurchflusszytometrie analysiert. In Übereinstimmung mit der Publikation von Nguyen fiel an d40 nach alloKMT (14d nach erstmaliger DT-Gabe) eine ausgeprägte Zytopenie in Milz und LK in DT-behandelten Tieren auf, die ähnlich ist wie in Tieren mit aGVHD nach adoptivem Transfer konventioneller Spender-T-Zellen am Tag der KMT [112]. Darüber hinaus fanden wir auch signifikant verminderte Zellzahlen im KM. Interessanterweise zeigten jedoch auch PBS-behandelte Versuchstiere gegenüber untransplantierten Mäusen eine markante Reduktion der reisolierbaren Leukozyten. Aufarbeitungen zu einem späteren Zeitpunkt nach alloKMT belegten eine anhaltende Zytopenie in der Milz, so dass es sich hierbei am ehesten um subklinische Folgen der Alloreaktion in diesem System handelt (bei fehlender aGVHD-Symptomatik) und nicht um eine noch nicht vollständige Rekonstitution (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe). In Milz und LK von transplantierten Tieren konnte – ähnlich wie von Nguyen *et al.* [112] – gezeigt werden, dass die Zellarmut in erster Linie auf einer Defizienz von B-Zellen und T-Zellen beruht, wohingegen myeloische Zellen wie Granulozyten und Monozyten auf dem Niveau unbehandelter Tiere lagen oder dieses deutlich überstiegen. Insbesondere die B-Zell-Defizienz scheint ein sensibler Marker für die Schwere der aGVHD zu sein, wie in einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe bereits detailliert beschrieben [Promotionsarbeit K. Doser, Untersuchungen zur B-Zell-Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation und in klinischen Untersuchungen bestätigt [113]]. Im Unterschied zu Experimenten im selben Tiermodell, in denen durch den adoptiven Transfer von Spender-Tconv an Tag 0 GVHD ausgelöst wurde, zeigte sich in den mit DT-behandelten Transplantatempfängern kein erhöhter Gehalt an Milz-T-Zellen [82]. Eine Erklärung hierfür könnte in den unterschiedlichen Versuchsanordnungen begründet sein, da T-Zellen in der Lymphopenie früh nach KMT dramatisch expandieren, während sie nach lymphatischer Regeneration mit anderen Lymphozyten konkurrieren. Alternativ könnte es auch im untersuchten Modell kurz nach Treg-Elimination zu einer frühen Expansion alloreaktiver

Spender-T-Zellen gekommen sein, die sich zum gewählten Analysezeitpunkt (14d nach Treg-Elimination) bereits nicht mehr nachweisen lässt. Darüber hinaus sind die Unterschiede in der Menge reisolierbarer Milz-T-Zellen durch die unterschiedliche Architektur der Lymphorgane erklärbar (Lymphopenie 5d post alloKMT vs. rekonstituierter Hämatopoese an d26 post alloKMT). Die Subtyp-Analysen zeigten in Milzen und LK von Treg-depletierten Tieren signifikant erhöhte Anteile an CD8⁺ T-Zellen unter allen T-Zellen. Im KM dominierten hingegen Spender-CD4⁺ Tconv in prozentualen Anteilen unter allen T-Zellen und sie waren sowohl in absoluten Zellzahlen nach DT-Gabe als auch bei alleiniger Tconv-Gabe in diesem Kompartiment signifikant erhöht. Diese Befunde stehen im Einklang mit der Erkenntnis, dass die aGVHD im verwendeten full-mismatch-Modell hauptsächlich von CD4⁺ Spender-Tconv getragen wird, jedoch durch CD8⁺ Spender-Tconv deutlich aggraviert werden kann [69, 82, 100].

Im Unterschied zu untransplantierten Tieren, in denen erst die fortgesetzte Suppression des Treg-Kompartments zu einem fatalen lymphoproliferativen Syndrom führt [84, 114], unterstreichen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen die Relevanz eines durchgehend funktionellen Treg-Kompartments und zeigen, dass bereits die temporäre Elimination von Spender Treg zu einer GVHD-Induktion ausreicht.

Der Gastrointestinaltrakt stellt nicht nur eines der wichtigsten Zielorgane der aGVHD dar, sondern er ist auch Ort der Induktion, Aufrechterhaltung und Potenzierung der Alloreaktion [74]. Unter physiologischen Bedingungen sorgt ein komplexes System aus physikalischen Barrieren und Mechanismen der angeborenen und erworbenen Abwehr für eine Kompartimentalisierung von Fremd und Selbst [115]. Aufgrund konditionierungsbedingter Gewebeschäden kommt es nach alloKMT zur Störung der gastrointestinalen Barrierefunktion und damit zur Invasion mikrobieller Erreger bzw. zur Exposition mit immunaktivierenden Erregerbestandteilen (sog. *pathogen associated molecular pattern*) [73]. Ein kritischer Mediator in der Entwicklung der aGVHD ist der Zellwandbestandteil LPS von gramnegativen Bakterien [72] und frühe Erkenntnisse aus Transplantationsexperimenten an keimfrei gezüchteten oder antibiotisch behandelten Mäusen belegen einen klaren Zusammenhang zwischen der Schwere der aGVHD und der Bakterienlast im Transplantatempfänger [116, 117]. Deshalb bildeten Untersuchungen der immunologischen Vorgänge im Gastrointestinaltrakt einen Schwerpunkt im Rahmen dieser Dissertation. Nachdem bereits die histologischen Untersuchungen eine starke Darmaffektion DT-behandelter Tiere zeigten, wurde versucht, die zellulären Vorgänge durch Reisolierung von gewebeinfiltrierenden Leukozyten detaillierter zu charakterisieren. Dabei konnten unter differenzierter Betrachtung

der zwei distinkten Immunkompartimente der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) und der Lamina Propria Lymphozyten (LPL) jeweils des Dick- und Dünndarms interessante Befunde erhoben werden. Analog zu klinisch-pathologischen Beobachtungen der durch Spender-Tconv induzierten murinen aGVHD [118] waren Auswirkungen der DT-Administration auf den Dickdarm prominenter als auf den Dünndarm. Es fiel auf, dass sich aus Dickdärmen von DT-Tieren hochsignifikant mehr intraepitheliale und Lamina Propria-ständige Leukozyten extrahieren ließen als aus Tieren der PBS-Gruppe oder untransplantierten Mäusen. Im Dünndarm waren die Veränderungen in den Zellzahlen ähnlich, jedoch erreichten aufgrund der großen Streuung der Einzelwerte nur die Unterschiede in den IEL statistische Signifikanz. Damit decken sich die zellulären Befunde mit der histologischen Begutachtung, die typischerweise ebenfalls auffällige leukozytäre Infiltrate bei Darm-GVHD nachweist [81, 101, 102]. Die phänotypische Einordnung zeigte, dass die Infiltration von Entzündungszellen – auch hier am akzentuiertesten im Dickdarm – maßgeblich auf alloreaktive T-Zellen zurückzuführen ist, was im Einklang steht mit den pathophysiologischen Mechanismen der murinen und humanen aGVHD [91, 119]. Nach Treg-Depletion zeigte sich eine dominante T-Zell-Infiltration in absoluten Zellzahlen in allen untersuchten Kompartimenten sowie eine relative Vermehrung (bezogen auf CD45⁺ Zellen) in der Lamina Propria des Dickdarms. Im direkten Vergleich zu den Verhältnissen in der Lamina Propria von unbehandelten Spendern und Empfängern, in welchen B220⁺ B-Zellen vor CD11b⁺Gr1⁺ Monozyten die dominierenden Leukozytensubsets darstellen, werden die derangierten Verhältnisse der Zellkomposition DT-behandelter Tiere am deutlichsten. Die weitere Charakterisierung der T-Zell-Subpopulationen bestätigte die immunhistologischen Befunde einer anhaltenden Treg-Defizienz nach DT-Gabe. Die Ursache der insuffizienten Treg-Regeneration nach transienter Depletion sind noch nicht im Detail untersucht, ähneln aber klinischen Daten in denen eine Treg-Defizienz bei Patienten mit aGVHD-Kolitis nachgewiesen wurde, nicht jedoch bei Patienten mit Koliden anderer Genese [107]. Die Depletion von Treg bewirkte eine eindruckliche Verschiebung in Richtung CD4⁺CD8⁺ T-Zellen (*double negative*, DN⁺ T-Zellen) in der Lamina Propria des Dick- und Dünndarms. In absoluten Zellzahlen zeigte sich eine hochsignifikante Erhöhungen von DN⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen in der Lamina Propria des Dickdarms bei subtileren Befunden im makroskopisch und histologisch weniger stark betroffenen Dünndarm. Als Ursache der anteiligen und absoluten Verschiebungen innerhalb des T-Zellkompartiments konnte eine verstärkte Teilungsaktivität von DN⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden, wie anhand der verstärkten Expression des intrazellulären Teilungsmarkers Ki-67 gezeigt. In der Summe beweisen diese Experimente, dass die solitäre Eliminierung von

Spender-Treg ausreicht, residuelle alloreaktive Spender-Tconv zu reaktivieren, die dann expandieren und GVHD-Zielorgane infiltrieren [72, 82]. Die Akkumulation von Effektorzellen ist begleitet von der Proliferation alloreaktiver T-Zellen im Zielorgan. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch in klassischen GVHD-Modellen (adoptiver Tconv-Transfer), in denen mittels Biolumineszenzbildgebung ebenfalls die T-Zell-Infiltration des Darmes nachgewiesen wurde [120, 121]. Ob der Darminfiltration nach Treg-Depletion ein *priming* mit nachfolgender Expansion alloreaktiver Spender-Tconv in den mesenterialen Lymphknoten vorangeht [81, 121], wird durch das Versuchsdesign nicht abgebildet und könnte in zukünftigen Experimenten durch eine frühere Aufarbeitungen nach DT-Gabe geklärt werden. Im intraepithelialen Kompartiment zeigte sich eine Zunahme von CD8⁺ T-Zellen nach Spender-Treg-Depletion, aber auch CD4⁺ Tconv waren in absoluten Zahlen deutlich erhöht nachweisbar und zeigten eine verstärkte Teilungsaktivität. In nicht transplantierten Tieren führt die Treg-Depletion über einen längeren Zeitraum (10-21d) zu einem Proliferationsreiz in der Milz, den LK, der Lunge und der Leber [84], nicht jedoch im Dickdarm wie aus immunhistochemischen Färbungen [122] und durchflusszytometrischen Untersuchungen hervorgeht. Insofern scheint sich die aGVHD nach Treg-Depletion von den Darmveränderungen Treg-defizienter nicht-transplantierte Tiere deutlich zu unterscheiden. Wie für andere immunologische Kompartimente aus klassischen aGVHD Modellen bekannt, zeigen auch DT-behandelte Transplantatempfänger in der Lamina Propria nur geringe Mengen bzw. prozentuale Anteile an B220⁺ B-Zellen [[113], K. Doser, Untersuchungen zur B-Zell-Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation]. Interessanterweise zeichneten sich aber auch Tiere der PBS-Gruppe durch eine B-Zell-Defizienz der Lamina Propria aus. In Modellen der haploidenten KMT [parent → F1] wurde hingegen eine rasche Regeneration des B-Zell-Kompartiments in GVHD-freien Tieren nachgewiesen (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe). Der B-Zell-Defizienz in PBS-behandelten Tieren könnten also wiederum subklinische Alloreaktionen zugrunde liegen, alternativ könnte die Rekonstitutionskinetik von B-Zellen im gewählten Modell verzögert sein. Zur Klärung dieser Frage sollten in zukünftigen Experimenten Aufarbeitungen zu einem späteren Zeitpunkt nach DT-Gabe durchgeführt werden.

Die GVHD-induzierte Inflammation geht im murinen und humanen System mit erhöhten Spiegeln proinflammatorischer Zytokine einher, was u.a. diagnostisch [123, 124] und therapeutisch genutzt wird [72, 74, 125]. Aus diesem Grund wurden mittels quantitativer *real-time-Polymerasekettenreaktion* (qRT-PCR) einige aGVHD-relevante Parameter in Dick- und Dünndarmhomogenisaten bestimmt und das Zytokinmilieu als Surrogat für systemische

Veränderungen näher charakterisiert. Als Positivkontrolle ließ sich auf transkriptioneller Ebene nachweisen, dass die DT-Gabe zu einem anhaltenden Foxp3-Verlust in den Transplantatempfängern führt. Dagegen zeigen Tiere der PBS-Gruppe, im Einklang mit den Ergebnissen der immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Foxp3-Färbungen, deutlich erhöhte Foxp3-Expressionsraten, die auch über denen unbehandelter Spender oder Empfänger liegen. Diese Überexpression scheint reaktiv im Rahmen der Geweberegeneration nach Konditionierung stattzufinden [16, 126], darüber hinaus wurde eine vermehrte Aktivierung und Proliferation von Spender-Treg durch starke allogene Stimulation im Empfängerorganismus gezeigt [127]. Diese *in vivo* Expansion kann u.a. therapeutisch genutzt werden, da ein vorgezogener Spender-Treg-Transfer deren Effektivität zur Prophylaxe der aGVHD erhöht [128].

Wie zunehmend evident wird, kommt Treg nicht nur in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz eine Schlüsselfunktion zu. So wurde gezeigt, dass zahlreiche primär nicht immunologische Vorgänge wie etwa Reparaturprozesse entscheidend von Treg mitgetragen werden [16, 129]. Synergistisch hierzu, kommt den kryptennah lokalisierten Paneth-Zellen des oberen Intestinum eine große Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Gewebsintegrität zu [130]. Im Einklang mit den histopathologischen Befunden eines GVHD-spezifischen Paneth-Zellverlusts, zeigten sich im Dünndarmlysat DT-behandelter Tiere signifikant verminderte Konzentrationen an Reg3- γ , einem Marker-Defensin dieser Zellart [104]. Trotz lichtmikroskopisch leicht reduzierter Anzahl synthetisierender Paneth-Zellen wird Reg3- γ , a.e. im Rahmen der ablaufenden Reparaturvorgänge bei subklinischer Alloreaktion, hochreguliert [131]. Ähnliche Veränderungen wurden durch Eriguchi *et. al.* in einem anderen murinen GVHD-Modell nachgewiesen [104]. Im humanen Setting sind hohe Spiegel des Strukturanalogs Reg3- α im Serum Hinweis auf eine untere gastrointestinale aGVHD, eine scheinbar paradoxe Erscheinung, die durch das vermehrte Übertreten dieses eigentlich nach endoluminal sezernierten Moleküls in die systemische Zirkulation im Rahmen der aGVHD erklärt wird [132]. Die Quantifizierung von Panethzellen in duodenalen Biopsien zum Zeitpunkt der Erstdiagnose von aGVHD wurde als prognostischer Parameter vorgeschlagen, da eine inverse Korrelation zwischen der Schwere der aGVHD und der Anzahl von Panethzellen gefunden wurde [103]. IL-22, welches die Synthese von Reg3- γ fördert und ähnlich wie letzteres als Surrogatmarker für Epithelregeneration gilt [133], ist in Tieren der PBS-Gruppe wie erwartet erhöht, nicht jedoch in der DT-Gruppe, wobei nur Unterschiede in Dünndärmen Signifikanz erreichten. Dazu passend zeigten PBS-Tiere erhöhte Expressionsraten des an sich proinflammatorischen Zytokins IL-17, für welches jedoch in

Kombination mit IL-22 ebenfalls gewebeprotective Effekte gezeigt werden konnten [134]. Ob die erniedrigte Expression in DT-Tieren als Versagen dieses Reparaturmechanismus gedeutet werden kann, lässt sich anhand der vorliegenden Daten noch nicht eindeutig beantworten, soll in künftigen Experimenten aber geklärt werden. Die Interpretation der qRT-PCR-Daten aus Gewebekompositen ist methodisch durch die Tatsache erschwert, dass erhöhte Expressionsraten von antiinflammatorischen Zytokinen sowohl Immunhomöostase anzeigen können, aber auch kompensatorisch zur Eindämmung einer bereits etablierten Immunpathologie ansteigen. So bewirkte eine Defizienz von Spender-Treg, unter physiologischen Bedingungen Hauptproduzenten von IL-10 im Dickdarm, eine in der Tendenz reduzierte Expressionsrate dieses antiinflammatorischen Zytokins im Dickdarm, wobei andere Produzenten, u.a. Tr-1-Zellen im Dünndarm ihre IL-10 Expression steigerten und damit der massiven Gewebeentzündung entgegenwirkten [135]. Auch alloreaktive T-Zellen können ihre IL-10 Sekretion z.T. hochregulieren [136]. Auffallend und in guter Übereinstimmung mit zahlreichen anderen Erkenntnissen der experimentellen und klinischen aGVHD-Forschung [69, 79] zeigten erkrankte Mäuse als Ausdruck der Immundysbalance starke Erhöhungen proinflammatorischer Zytokine. So ließ sich eine gesteigerte Transkriptionsrate von MIP-2, CCL-2, INF- γ und TNF in Darmhomogenisaten Treg-depletierter Tiere nachweisen, wobei die Erhöhung der Expressionsraten im klassischen aGVHD-Zielorgan Dickdarm markanter war als im Dünndarm. Zusammenfassend spiegeln die qRT-PCR-Daten von Spender-Treg-depletierten Tieren einen für die Endstrecke einer aGVHD klassischen Zustand profuser Entzündungsaktivität wider, der die anderen erhobenen Befunde untermauert und ergänzt.

Diskussionswürdig bleiben die Ergebnisse der frühen Spender-Treg-Ausschaltung an d5, 7 und 9 nach alloKMT. Zwar waren teilweise ähnliche histologische und zelluläre Veränderungen sowie Verschiebungen des Zytokinemilieus detektierbar, jedoch fiel auf, dass die Treg-Depletion an d5, 7 und 9 im Unterschied zur Depletion an d26, 28 und 30 keine letale GVHD-Erkrankung auslöst. An d58 nach erstmaliger DT-Gabe (d63 nach alloKMT) zeigten solche Tiere nur noch geringe histologische Alterationen des Dick- und Dünndarms, die Anzahl der Panethzellen hatte sich wieder normalisiert und sowohl Treg als auch B-Zellen in KM und Milz sind regeneriert, alles Hinweise auf eine Genesung der Tiere. Im Detail konnte diese interessante Beobachtung anhand der durchgeführten Experimente nicht erklärt werden. Es zeigten sich Unterschiede zwischen den beiden Szenarien, z.B. in den Verhältnissen der einzelnen T-Zell-Subpopulationen in Milz, KM und LK 14d nach erstmaliger DT-Gabe (niedrige CD4⁺/CD8⁺ T-Zell-Verhältnisse bei früher Spender-Treg-

Depletion). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sich die Menge an reisolierbaren Leukozyten aus den intestinalen Geweben unterscheiden. So konnten aus der Lamina Propria des Dickdarms bei später Spender-Treg-Elimination im Mittel 4,4-fach mehr allogene CD45⁺ Zellen reisoliert werden als bei früher Manipulation ($8,2 \pm 0,68 \times 10^6$ vs. $1,85 \pm 0,33 \times 10^6$). Analoge Differenzen fanden wir für das intraepitheliale Kompartiment des Dickdarms ($5,62 \pm 0,75 \times 10^6$ vs. $1,16 \pm 0,18 \times 10^6$, entsprechend 4,8-fach). Da die Darmschädigung primär für die Mortalität der alloKMT entscheidend ist [73], erscheint die verminderte T-Zell-Infiltration nach früher Treg-Depletion von Bedeutung zu sein. Ob und wie die frühe Treg-Depletion das Engraftment und die Funktion alloreaktiver Tconv-Zellen beeinflusst bleibt also in zukünftigen Experimenten zu klären. Aufarbeitungen zum Zeitpunkt der erstmaligen DT-Gabe (um d5) könnten eventuell Hinweise auf die relevanten Immunmechanismen liefern, die in der frühen Phase nach alloKMT die Expansion von alloreaktiven Spender-Tconv limitieren. Eine gesteigerte frühe Tconv-Proliferation nach Treg-Depletion könnte z.B. zu einer erhöhten Rate an Aktivierungs-induziertem Zelltod im alloreaktiven T-Zell-Pool führen und dadurch langfristig die GVHD-Letalität vermindern [137].

Besonders bemerkenswert waren die gefundenen Ergebnisse auch vor dem Hintergrund einer Studie von Pierini et. al., in der gezeigt werden konnte, dass Spender-Treg im selben Modell vor allem früh nach alloKMT protektive Effekte besitzen und deren Elimination zu einem späteren Zeitpunkt ohne relevante Folgen auf Mortalität und Morbidität bleibt [138]. Relativierend ist jedoch einzuwenden, dass die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die eigenen Daten durch Unterschiede im Transplantat und Schema der DT-Depletion (adoptiver Donor-Treg-Transfer (5×10^5) + T-Zell-depletiertes KM (5×10^6) + Tconv (1×10^6) vs. KMges ($2,5 \times 10^6$) bzw. 3 malige vs. 2 malige DT-Gabe) nicht unproblematisch ist. Insgesamt zeigen die in Rahmen dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse die zentrale Rolle auf, die Spender-Treg im Kontext der alloKMT zukommt. Es konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche Unterdrückung von alloreaktiven Spender-T-Zellen durch ein funktionierendes Spender-Treg-Kompartiment eine *conditio sine qua non* für die Langzeittoleranz nach alloKMT darstellt. Diese Erkenntnisse rechtfertigen erneut die präklinischen und klinischen Anstrengungen zahlreicher Gruppen zur Untersuchung des Spender-Treg-Transfers zur Prophylaxe und/oder Therapie der aGVHD.

5 Zusammenfassung

Die allogene Knochenmarktransplantation (alloKMT) ist eine potentiell kurative Therapieoption für Patienten mit andernfalls inkurablen hämatologischen Erkrankungen. Die Rolle der im Transplantat erhaltenen Spender-T-Zellen bleibt ambivalent, da sie neben einer Reihe gewünschter Effekte (z.B. *graft-versus-leucemia effect*) auch die u.U. lebensbedrohliche GVHD (*graft-versus-host-disease*) induzieren, weshalb die Indikation zur alloKMT auf Hochrisikopatienten eingeschränkt wird. Ein noch lückenhaftes Verständnis der zugrundeliegenden Immunmechanismen behindert eine breitere Indikationsstellung und erklärt den anhaltend hohen Forschungsbedarf in diesem Feld.

In murinen KMT-Modellen induziert die Transplantation von unmanipuliertem Gesamt-Knochenmark (KMges) keine klinische GVHD. Um diesbezüglich die Rolle von Spenderstämmigen $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen (Treg) zu untersuchen, wurden MHC-differente (C57BL/6 \rightarrow BALB/c; H-2^b \rightarrow H-2^d) Knochenmarktransplantationen unter Verwendung von $2,5 \times 10^6$ KMges von transgenen Tieren durchgeführt, die unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors den Diphtherietoxinrezeptor exprimieren. Hierdurch konnten Spender-Treg zu unterschiedlichen Zeitpunkten (d5 vs. d26) nach KMT *in vivo* eliminiert und die Auswirkungen der Treg-Depletion untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die selektive Ausschaltung von Spender-Treg an d26 in bis dahin gesunden und erfolgreich regenerierten Transplantatempfängern eine akut verlaufende, letale Erkrankung induziert. Diese zeigte alle klinischen und histologischen Zeichen der akuten GVHD (aGVHD), vor allem ausgeprägte entzündliche Veränderungen mit leukozytären Infiltraten, gesteigerten Apoptoseraten und epithelialregeneratorischen Arealen in Dick- und Dünndarm. Die aGVHD war begleitet von einer T-Zell-Infiltration in den Darm mit gesteigerter T-Zell-Proliferation sowie dem GVHD-typischen Verlust von Paneth-Zellen (die unter physiologischen Bedingungen für die Homöostase darmbesiedelnder Mikroorganismen sorgen und für den Schutz intestinaler Stammzellen notwendig sind). Mittels quantitativer RT-PCR wurde eine begleitende Hochregulierung inflammatorischer Zytokine im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen sowie der langfristige Verlust des Treg-Kompartiments nach passagerer Depletion bestätigt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Spender-Treg auch langfristig für die Toleranzinduktion und –aufrechterhaltung nach allogener Knochenmarktransplantation von zentraler Bedeutung sind.

6 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, 20.06.2018

Ort, Datum



Unterschrift des Verfassers

7 Publikationsverzeichnis

1. Kyewski, B. and L. Klein, *A central role for central tolerance*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 571-606.
2. Danke, N.A., et al., *Autoreactive T cells in healthy individuals*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 5967-72.
3. Jordan, M.S., et al., *Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 301-6.
4. Itoh, M., et al., *Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5317-26.
5. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
6. Kuniyasu, Y., et al., *Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation*. Int Immunol, 2000. **12**(8): p. 1145-55.
7. Hoffmann, P., et al., *Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells*. Blood, 2004. **104**(3): p. 895-903.
8. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
9. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
10. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
11. Huehn, J., J.K. Polansky, and A. Hamann, *Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(2): p. 83-9.
12. Hori, S., *The Foxp3 interactome: a network perspective of T(reg) cells*. Nature immunology, 2012. **13**(10): p. 943-5.
13. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
14. Wildin, R.S., et al., *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 18-20.
15. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
16. Rothstein, D.M. and G. Camirand, *New insights into the mechanisms of Treg function*. Curr Opin Organ Transplant, 2015. **20**(4): p. 376-84.
17. Arpaia, N., et al., *A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection*. Cell, 2015. **162**(5): p. 1078-89.
18. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1969-80.

19. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
20. Hawrylowicz, C.M. and A. O'Garra, *Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 271-83.
21. Asseman, C., et al., *An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 995-1004.
22. Rubtsov, Y.P., et al., *Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 546-58.
23. Kearley, J., et al., *Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent*. J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1539-47.
24. Jankovic, D., et al., *Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection*. J Exp Med, 2007. **204**(2): p. 273-83.
25. Marie, J.C., et al., *TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Exp Med, 2005. **201**(7): p. 1061-7.
26. Liu, Y., et al., *A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 632-40.
27. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
28. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 629-44.
29. Andersson, J., et al., *CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 1975-81.
30. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 636-45.
31. Maynard, C.L., et al., *Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 931-41.
32. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
33. Liu, Y., et al., *IL-35 mitigates murine acute graft-versus-host disease with retention of graft-versus-leukemia effects*. Leukemia, 2015. **29**(4): p. 939-46.
34. de la Rosa, M., et al., *Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2480-8.
35. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
36. Kobie, J.J., et al., *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6780-6.
37. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
38. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1225-32.

39. Zarek, P.E., et al., *A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells*. Blood, 2008. **111**(1): p. 251-9.
40. Bopp, T., et al., *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1303-10.
41. McHugh, R.S., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 311-23.
42. Zhao, D.M., et al., *Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3925-32.
43. Cao, X., et al., *Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 635-46.
44. Ren, X., et al., *Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells*. Cell Death Differ, 2007. **14**(12): p. 2076-84.
45. Garin, M.I., et al., *Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2058-65.
46. Rabinovich, G.A., et al., *Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?* Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 313-20.
47. Baum, L.G., et al., *Amelioration of graft versus host disease by galectin-1*. Clin Immunol, 2003. **109**(3): p. 295-307.
48. Rabinovich, G.A., et al., *Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis*. J Exp Med, 1999. **190**(3): p. 385-98.
49. Offner, H., et al., *Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Journal of neuroimmunology, 1990. **28**(2): p. 177-84.
50. Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars, *CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1538-43.
51. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 295-302.
52. Read, S., et al., *Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4376-83.
53. Wing, K., et al., *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function*. Science, 2008. **322**(5899): p. 271-5.
54. Joly, E. and D. Hudrisier, *What is trogocytosis and what is its purpose?* Nat Immunol, 2003. **4**(9): p. 815.
55. Onishi, Y., et al., *Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10113-8.
56. Waterhouse, P., et al., *Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4*. Science, 1995. **270**(5238): p. 985-8.
57. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
58. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
59. Huang, C.T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 503-13.

60. Liang, B., et al., *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5916-26.
61. Copelan, E.A., *Hematopoietic stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2006. **354**(17): p. 1813-26.
62. Martin, P.J., et al., *Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts*. Blood, 1985. **66**(3): p. 664-72.
63. Edinger, M. and P. Hoffmann, *Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(5): p. 679-84.
64. Edinger, M., *Regulatory T cells for the prevention of graft-versus-host disease: professionals defeat amateurs*. Eur J Immunol, 2009. **39**(11): p. 2966-8.
65. Horowitz, M.M., et al., *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation*. Blood, 1990. **75**(3): p. 555-62.
66. Storb, R., *Reduced-intensity conditioning transplantation in myeloid malignancies*. Curr Opin Oncol, 2009. **21 Suppl 1**: p. S3-5.
67. Martin, P.J., et al., *A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment*. Blood, 1990. **76**(8): p. 1464-72.
68. Hobbs, G.S. and M.A. Perales, *Effects of T-Cell Depletion on Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcomes in AML Patients*. J Clin Med, 2015. **4**(3): p. 488-503.
69. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease*. Lancet, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
70. Billingham, R.E., *The biology of graft-versus-host reactions*. Harvey Lect, 1966. **62**: p. 21-78.
71. Ferrara, J., *Location, location, location*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 103-4.
72. Ferrara, J.L., K.R. Cooke, and T. Teshima, *The pathophysiology of acute graft-versus-host disease*. Int J Hematol, 2003. **78**(3): p. 181-7.
73. Hill, G.R., et al., *Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines*. Blood, 1997. **90**(8): p. 3204-13.
74. Hill, G.R. and J.L. Ferrara, *The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, 2000. **95**(9): p. 2754-9.
75. Wu, Z., et al., *Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 87-92.
76. Suchin, E.J., et al., *Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 973-81.
77. Teshima, T., et al., *Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium*. Nat Med, 2002. **8**(6): p. 575-81.
78. Shlomchik, W.D., et al., *Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells*. Science, 1999. **285**(5426): p. 412-5.
79. Reddy, P. and J.L. Ferrara, *Immunobiology of acute graft-versus-host disease*. Blood Rev, 2003. **17**(4): p. 187-94.
80. Hoffmann, P., et al., *Donor-type CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation*. Journal of Experimental Medicine, 2002. **196**(3): p. 389-399.
81. Ermann, J., et al., *Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2220-6.
82. Edinger, M., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1144-50.

83. Hanash, A.M. and R.B. Levy, *Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1828-36.
84. Kim, J.M., J.P. Rasmussen, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 191-7.
85. Bennett, C.L. and H.D. Ochs, *IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena*. Curr Opin Pediatr, 2001. **13**(6): p. 533-8.
86. Mitamura, T., et al., *Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity*. J Biol Chem, 1995. **270**(3): p. 1015-9.
87. Cooke, K.R., et al., *An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin*. Blood, 1996. **88**(8): p. 3230-9.
88. Kaplan, D.H., et al., *Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5467-75.
89. Atkinson, K., *Bone marrow transplantation*. The Medical journal of Australia, 1992. **157**(6): p. 408-11.
90. Weiden, P.L., et al., *Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts*. N Engl J Med, 1979. **300**(19): p. 1068-73.
91. Shlomchik, W.D., *Graft-versus-host disease*. Nature reviews Immunology, 2007. **7**(5): p. 340-52.
92. Welniak, L.A., B.R. Blazar, and W.J. Murphy, *Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Annual review of immunology, 2007. **25**: p. 139-70.
93. Hoffmann, P., et al., *Immunomodulation after allogeneic bone marrow transplantation by CD4+CD25+ regulatory T cells*. Microbes Infect, 2005. **7**(7-8): p. 1066-72.
94. Cohen, J.L., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 401-6.
95. Taylor, P.A., C.J. Lees, and B.R. Blazar, *The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3493-9.
96. Jones, S.C., G.F. Murphy, and R. Korngold, *Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD425 T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response*. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation, 2003. **9**(4): p. 243-56.
97. Martelli, M.F., et al., *HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse*. Blood, 2014. **124**(4): p. 638-44.
98. Zeng, D., et al., *Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease*. The Journal of experimental medicine, 1999. **189**(7): p. 1073-81.
99. Zeng, D., et al., *Unique patterns of surface receptors, cytokine secretion, and immune functions distinguish T cells in the bone marrow from those in the periphery: impact on allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, 2002. **99**(4): p. 1449-57.

100. Reddy, P., R. Negrin, and G.R. Hill, *Mouse models of bone marrow transplantation*. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation, 2008. **14**(1 Suppl 1): p. 129-35.
101. Schneidawind, D., et al., *CD4⁺ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells*. Blood, 2014. **124**(22): p. 3320-8.
102. Leveson-Gower, D.B., et al., *Low doses of natural killer T cells provide protection from acute graft-versus-host disease via an IL-4-dependent mechanism*. Blood, 2011. **117**(11): p. 3220-9.
103. Levine, J.E., et al., *Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality*. Blood, 2013. **122**(8): p. 1505-9.
104. Eriguchi, Y., et al., *Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins*. Blood, 2012. **120**(1): p. 223-31.
105. Parry, L., et al., *Evidence for a crucial role of paneth cells in mediating the intestinal response to injury*. Stem Cells, 2013. **31**(4): p. 776-85.
106. Barnes, M.J. and F. Powrie, *Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 401-11.
107. Rieger, K., et al., *Mucosal FOXP3⁺ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD*. Blood, 2006. **107**(4): p. 1717-23.
108. Lu, S.Y., et al., *High frequencies of CD62L(+) naive regulatory T cells in allografts are associated with a low risk of acute graft-versus-host disease following unmanipulated allogeneic haematopoietic stem cell transplantation*. Clin Exp Immunol, 2011. **165**(2): p. 264-77.
109. Fujioka, T., et al., *Frequency of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T-cells at early stages after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic SCT predicts the incidence of acute GVHD*. Bone Marrow Transplant, 2013. **48**(6): p. 859-64.
110. Dertschnig, S., et al., *Impaired thymic expression of tissue-restricted antigens licenses the de novo generation of autoreactive CD4⁺ T cells in acute GVHD*. Blood, 2015. **125**(17): p. 2720-3.
111. Fukushima, N., et al., *Thymus: a direct target tissue in graft-versus-host reaction after allogeneic bone marrow transplantation that results in abrogation of induction of self-tolerance*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(16): p. 6301-5.
112. Nguyen, V.H., et al., *The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2008. **111**(2): p. 945-53.
113. Storek, J., et al., *Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2001. **98**(2): p. 489-91.
114. Molledo, B., S. Hemmers, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cell ablation causes acute T cell lymphopenia*. PloS one, 2014. **9**(1): p. e86762.
115. Belkaid, Y., N. Bouladoux, and T.W. Hand, *Effector and memory T cell responses to commensal bacteria*. Trends Immunol, 2013. **34**(6): p. 299-306.
116. van Bekkum, D.W., et al., *Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora*. Journal of the National Cancer Institute, 1974. **52**(2): p. 401-4.
117. Jones, J.M., R. Wilson, and P.M. Bealmeary, *Mortality and gross pathology of secondary disease in germfree mouse radiation chimeras*. Radiation research, 1971. **45**(3): p. 577-88.

118. Lan, F., et al., *Allogeneic bone marrow cells that facilitate complete chimerism and eliminate tumor cells express both CD8 and T-cell antigen receptor-alpha-beta*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3458-65.
119. Ferrara, J.L., et al., *The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease*. Stem Cells, 1996. **14**(5): p. 473-89.
120. Vaeth, M., *Selective NFAT targeting in T cells ameliorates GvHD while maintaining antitumor activity*. PNAS, 2014. **112**(4): p. 1125-1130.
121. Beilhack, A., et al., *In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets*. Blood, 2005. **106**(3): p. 1113-22.
122. Boehm, F., et al., *Deletion of Foxp3+ regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation*. BMC gastroenterology, 2012. **12**: p. 97.
123. Paczesny, S., et al., *A biomarker panel for acute graft-versus-host disease*. Blood, 2009. **113**(2): p. 273-8.
124. Levine, J.E., et al., *Acute graft-versus-host disease biomarkers measured during therapy can predict treatment outcomes: a Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network study*. Blood, 2012. **119**(16): p. 3854-60.
125. Chen, X., et al., *Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease*. Blood, 2009. **114**(4): p. 891-900.
126. Burzyn, D., C. Benoist, and D. Mathis, *Regulatory T cells in nonlymphoid tissues*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 1007-13.
127. Nguyen, V.H., et al., *In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation*. Blood, 2007. **109**(6): p. 2649-56.
128. Di Ianni, M., et al., *Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3921-8.
129. Zhang, C., et al., *'Repair' Treg Cells in Tissue Injury*. Cell Physiol Biochem, 2017. **43**(6): p. 2155-2169.
130. Sato, T., et al., *Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 415-8.
131. Loonen, L.M., et al., *REG3gamma-deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum*. Mucosal Immunol, 2013.
132. Ferrara, J.L., et al., *Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease*. Blood, 2011. **118**(25): p. 6702-8.
133. Hanash, A.M., et al., *Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease*. Immunity, 2012. **37**(2): p. 339-50.
134. Liang, S.C., et al., *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2271-9.
135. Brown, E.M., M. Sadarangani, and B.B. Finlay, *The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine*. Nat Immunol, 2013. **14**(7): p. 660-7.
136. O'Garra, A. and P. Vieira, *T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 425-8.
137. Green, D.R., N. Droin, and M. Pinkoski, *Activation-induced cell death in T cells*. Immunol Rev, 2003. **193**: p. 70-81.

138. Pierini, A., et al., *Donor Requirements for Regulatory T Cell Suppression of Murine Graft-versus-Host Disease*. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950), 2015. **195**(1): p. 347-55.